

Universidad Autónoma de Madrid

Programa de Doctorado en Biociencias Moleculares

Papel de la Pro-Proteína Convertasa Subtilisina Kexina de Tipo 9 (PCSK9) en
el Macrófago. Implicaciones en el Desarrollo de Aterosclerosis

César Eduardo Rosales Mendoza

Madrid, 2017.

Departamento de Bioquímica

Facultad de Medicina

Universidad Autónoma de Madrid

Papel de la Pro-Proteína Convertasa Subtilisina Kexina de Tipo 9 (PCSK9) en
el Macrófago. Implicaciones en el Desarrollo de Aterosclerosis

César Eduardo Rosales Mendoza

Licenciado en Medicina

Lisardo Bosca

Director

Instituto de Investigaciones Biomédicas 'Alberto Sols'



El Dr. **Lisardo Boscá Gomar** certifica que **César Eduardo Rosales Mendoza**, licenciado en Medicina por la Universidad Autónoma de Nuevo León, México, ha realizado el trabajo de investigación titulado: **"Papel de la Pro-proteína Convertasa Subtilisina/Kexina de Tipo 9 (PCSK9) en el Macrófago. Implicaciones en el Desarrollo de Aterosclerosis"** bajo su dirección en el Instituto de Investigaciones Biomédicas 'Alberto Sols', para optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid.

Revisado el presente trabajo, expresa su conformidad para la presentación del mismo considerando que reúne los requisitos necesarios para ser sometido a discusión ante el Tribunal correspondiente.

Firmado, para que conste a todos los efectos, en Madrid, a 19 de Junio de 2017.

Fdo. **Lisardo Boscá Gomar**

Director de Tesis

Investigador Científico – CSIC

VºBº Tutora

Ángela María Martínez Valverde

Investigadora Científica – CSIC

Esta memoria de tesis ha sido realizada gracias al
Programa de Becas de Posgrado en el
Extranjero CONACYT-Nuevo León (CV636510)



Agradecimientos

Agradecimientos

Esta tesis no habría sido posible sin el apoyo y compañía de todos aquellos que en el camino estuvieron presentes, a quienes estoy profundamente agradecido.

En primer lugar, quiero agradecer al Dr. **Lisardo Boscá**, por haberme acogido en su laboratorio y permitirme descubrir el mundo de la ciencia de su lado. Gracias por transmitirme su pasión por la investigación, por alentarme siempre, por adquirir poco a poco la formación científica que ahora poseo y por contar con su apoyo y confianza. Gracias por haber hecho de mí lo que ahora soy. Esta tesis es suya. Gracias a la Dra. **Marina Mojena**, que siempre de la manera más sincera y desinteresada posible me ha tendido su mano para ayudarme en todo momento de mi proyecto y mi vida. Por esto y mucho más, le doy mis infinitas gracias. La Dra. **Paloma Martín**, que siempre ha estado a mi lado aconsejándome, sugiriendo con cariño lo que es mejor en cada paso que doy. Por todo ello, le doy las gracias, Paloma. La Dra. **Susana Alemany**, con su inigualable actitud y simpatía, sacando una sonrisa a todo aquel que saluda. Ha sido un placer contar con su compañía y apoyo estos años.

Mis compañeros y amigos, sin ustedes, las cosas no tendrían sentido en el laboratorio. **Omar Motiño**, no puedo estar más agradecido contigo porque desde el primer día que llegué al laboratorio has estado siempre al pendiente de mí y procurando mi bienestar. Gracias por acompañarme en estos casi cuatro años de mi vida en Madrid. **Silvia González**, mi consejera científica, siempre he admirado tu forma de trabajar, tu independencia y tenacidad, pero sobretodo, tu disposición para estar allí cuando te necesito. No tengo ninguna duda que llegarás muy lejos. Gracias por contar con amigos como tú. **Luis Alberto Castro**, mi hermano en el laboratorio, siempre llevo conmigo tus primeras enseñanzas de trabajo y sigo agradeciendo el poder contar contigo aún en la distancia. Tenemos pendiente coincidir en México. **Daniel Francés**, gracias por compartir conmigo tu experiencia y siempre tener un momento para mí. Estés aquí o en Argentina, siempre les recuerdo a ti, a Renata y a tus niñas con mucho cariño. **Gemma Benito**, aunque sólo compartimos el primer año de mi estancia, tu humildad, sencillez y bondad en cada consejo y enseñanza que me diste siempre la recuerdo y me

fortalece para seguir avanzando. **Marta Paz**, tu compañía siempre tan cercana se agradece. Gracias por estar al tanto de mí y compartir gratos momentos en el laboratorio. **Rocío Brea**, mucho ánimo con la tesis, llegamos casi al mismo tiempo y los dos culminamos ahora. Estoy seguro que te irá muy bien. **Adrián Sáenz, Cristina Segovia y Emilio Acosta**, su paso por el grupo fue una gran experiencia para mí. El haber compartido con ustedes mi trabajo y enseñarles un poco de lo mucho que la ciencia ofrece ha sido una oportunidad invaluable para mí que no dejaré de agradecer. Gracias por su cariño y apoyo. **Adrián Povo**, gracias por llegar al grupo y mostrar siempre tu disposición por aprender y ayudar. **Sara Palacios, Lourdes Yuste, Raúl Sánchez, Ángela Molina, Ángela Sánchez, Marta Celorio**, su optimismo, alegría y calidez siempre han sido un privilegio al encontrármelos por los pasillos del departamento. Les agradezco mucho por todo.

Cynthia Reyes, José Luis Cedillo, David Ramiro, Pilar Rodríguez, Perla Gutiérrez, mi familia en la facultad. Muchas gracias por contar siempre con su apoyo y compañía. Uno se siente en casa cuando tiene amigos como ustedes. Muchas gracias.

José Avendaño, gracias por nuestra amistad desde el primer momento que comenzamos el camino en la Autónoma y poder decir que ahora somos colegas de trabajo. Seguiremos colaborando juntos.

Ysabel González, gracias por todo el amor y apoyo recibido a lo largo de estos años. Has sido mi querida abuela española. Te tengo un cariño grande por todas tus atenciones y te estaré siempre agradecido por todo. **Pedro Cabanach**, gracias por llegar a mi vida y acompañarme en esta etapa. Deseo que sean muchos momentos más.

Miro atrás y recuerdo el momento en que mi vida cambió por completo. La Dra. **Herminia Martínez** me alentó a que tomara un camino, la decisión de emprender el viaje a España e iniciar un proyecto que hoy culmina con la presentación de esta tesis. Gracias a ella hoy estoy escribiendo estas palabras que manifiestan mi profunda admiración y agradecimiento por su apoyo incondicional a mi persona en los primeros pasos de este trayecto. No habría conocido a ninguna de las maravillosas personas que he mencionado anteriormente. Usted dio el primer empuje para que yo llegara hasta aquí. Muchas gracias. Así mismo, al Dr. **Javier Regadera**, quien gracias al convenio que

ha impulsado a lo largo de muchos años entre la UAM y diversas universidades latinoamericanas, ha sido posible estrechar lazos y permitirme estar aquí. Le agradezco profundamente por ello.

Estar a 8,706 km de distancia de casa se dice fácil, pero para ello se requiere de mucha voluntad para seguir lejos de los tuyos. Mi querida familia, mis padres, **Margarita y José Juan** (Q.E.P.D.), que nunca dejaron que parara de soñar y que persiga mis sueños, hoy estoy aquí por ustedes. Les amo y agradezco todos los días por tenerles como mis padres. Mis hermanos **Leticia, José Juan y Susana**, gracias por todos los ánimos que recibo día a día de ustedes. Sé que, aunque lejos, nos sentimos más cerca que nunca. Los quiero mucho.

A mi familia entera y amigos en México, sin su apoyo no habría sido posible que estuviera aquí todo este tiempo. Los llevo conmigo siempre a donde voy.

A todos, gracias por acompañarme en este camino y dar sentido a las cosas. ¡Mi entera gratitud y cariño por siempre!

“Ser profundamente querido por alguien te da fortaleza,
y querer profundamente a alguien te da valor”

Lao-tsé.

Resumen

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte en el mundo. La aterosclerosis es la patología que subyace a la mayor parte de los eventos cardiovasculares conocidos. Los niveles altos de colesterol LDL son por mucho el principal factor que precipita el desarrollo de la enfermedad. Los macrófagos son los protagonistas de la respuesta inflamatoria que ocurre en la lesión aterosclerótica. En su intento por eliminar el exceso de colesterol, la inflamación crónica inducida por éstos perjudica más la lesión hasta el riesgo de ruptura y la consecuente de trombosis manifestada clínicamente como infarto al miocardio, ictus y otros eventos clínicos.

PCSK9 es una proteína producida principalmente por el hígado que actúa regulando los niveles del receptor de colesterol LDL a través de su degradación. Así, las mutaciones con ganancia de función de *PCSK9* ocasiona niveles elevados de LDL en sangre. Poco más se sabe de PCSK9 sobre su expresión y función en tejidos y órganos extrahepáticos. En el presente trabajo, investigamos el papel de PCSK9 en los macrófagos y tejidos vasculares. La expresión es nula en estos tejidos. Sin embargo, la administración exógena de PCSK9 promueve en el macrófago una disminución del receptor de LDL y del receptor CD36. Además, PCSK9 induce una mayor producción de especies reactivas de oxígeno y una mayor sensibilidad a la muerte inducida en estas células. Estos efectos se acompañan de una mayor expresión de la NADPH oxidasa *NOX2*, y su inhibición revierte los cambios observados por acción de PCSK9. Así mismo, PCSK9 promueve un discreto aumento en la migración de los macrófagos, los cuales expresan mayores niveles de *CXCL1* y *CD47*. Finalmente, la expresión de PCSK9 en suero de pacientes hipercolesterolémicos es mayor que en pacientes sanos y, en arterias de pacientes con aterosclerosis avanzada, PCSK9 se expresa a nivel proteico, lo que sugiere un depósito en la vasculatura de esta proteína proveniente del hígado, promoviendo así el desarrollo de aterosclerosis.

Abstract

Cardiovascular diseases are the main cause of death worldwide. Atherosclerosis is the underlying cause related to most of the clinical outcomes. High LDL cholesterol levels are by far the main factor that triggers the development of the disease. Macrophages are key players of the inflammatory response within the atherosclerotic lesion. In their attempt to eliminate the excess of cholesterol, the chronic inflammation induced by these worsen the plaque with the following rupture and thrombosis expressed as heart attack, ictus and other clinical events.

PCSK9 is a protein produced mainly by the liver that acts regulating the LDL receptor through its degradation. Thus, mutations with gain-of-function on *PCSK9* gene promote an increase in plasma LDL levels. Little is known about PCSK9 expression and function in extrahepatic tissues and organs. In the present work, we investigated the role of PCSK9 in macrophages and vascular tissues. There is no expression of this protein in macrophages, endothelium and vascular smooth muscle cells. However, the stimulation with exogenous PCSK9 promotes a degradation in LDL and CD36 receptors in macrophages. Besides, PCSK9 induced a higher production of reactive oxygen species and an increased sensibility to death in these cells. These changes are followed by a rise in the NADPH oxidase *NOX2* expression and its inhibition reverts these effects made by PCSK9. Also, PCSK9 promotes a discreet increase in macrophage migration, which express high levels of *CXCL1* and *CD47* due to PCSK9. Finally, the expression of PCSK9 in human hypercholesterolemic serum is higher than in healthy patients and, in arteries of patients with advanced atherosclerotic lesions, there is a protein expression of PCSK9, which suggest a deposit of hepatic PCSK9 in vascular tissues, and thus promoting the development of atherosclerosis.

Índice

Abreviaturas	15
Introducción	19
Aterosclerosis	19
Antecedentes	19
Fisiopatología de la aterosclerosis	22
Cascada de adhesión	23
Captura de lipoproteínas	23
Receptores <i>Scavenger</i>	24
Progresión de la lesión aterosclerótica	25
Polarización de macrófagos	27
PCSK9	27
Estrés oxidativo	30
Localización, estructura y funciones de las NOX	31
NOX2	32
Mecanismos de activación y regulación de NOX vasculares	33
Hipótesis y Objetivos	35
Material y Métodos	37
Ética	37
Muestras humanas	38
Arterias Femorales	38
Cultivo celular y transfecciones	38
Cultivo primario	38
Macrófagos humanos de sangre periférica	38
Macrófagos murinos peritoneales	39
Cultivo secundario	39
THP-1	39
HepG2	39
H-MEC	39

VSMC	40
Polarización de macrófagos	40
Silenciamiento de <i>LDL-R</i>	40
Generación de línea celular HepG2 <i>PCSK9</i> KO	40
Citometría de flujo	41
Especies reactivas de oxígeno (ROS)	41
Viabilidad/Apoptosis	42
Inmunodetección de proteínas	43
Fagocitosis	43
Microscopía	43
Inmunofluorescencia	43
Migración	44
Análisis de la expresión génica	44
Extracción de ARN	44
RT-PCR cuantitativa en tiempo real	44
Cebadores	45
Análisis de la expresión proteica	46
Obtención de extractos totales	46
Determinación de proteínas	46
Electroforesis de proteínas	46
Inmunodetección de proteínas Western-blot	46
Reactivos	47
Análisis estadístico	47
Resultados	49
Expresión de <i>PCSK9</i> en macrófagos y tejidos vasculares	49
<i>PCSK9</i> es secretada por el hígado e induce la disminución del receptor de colesterol LDL en macrófagos	51
La entrada de <i>PCSK9</i> no es dependiente de <i>LDL-R</i>	54
<i>PCSK9</i> disminuye CD36 en la superficie de los macrófagos	57
<i>PCSK9</i> aumenta el estrés oxidativo en macrófagos y la sensibilidad a la apoptosis	58
NOX2 media la producción de especies reactivas de oxígeno inducidas por <i>PCSK9</i>	60
<i>PCSK9</i> y su efecto sobre la fagocitosis y migración	62

PCSK9 se encuentra en lesiones ateroscleróticas avanzadas y en niveles mayores en suero de pacientes hipercolesterolémicos	63
Discusión	66
Conclusiones	72
Bibliografía	74

Abreviaturas

ACAT – Acetil-coenzima A acetil-transferasa
ApoB – Apolipoproteína B
ApoE – Apolipoproteína E
BSA – Albúmina de suero bovino
CCL5 – CC-ligando de quimioquina 5
CCR2 – CC-receptor de quimioquinas tipo 2
CD36 – Translocasa de ácidos grasos o receptor <i>scavenger</i> B3
CX3CL1 – Ligando de quimioquina tipo 1
CX3CR1 – Receptor de quimioquina tipo 1
CXCL1 – CXC-ligando de quimioquina 1
DAF-2 – 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoresceína
DNA – Ácido desoxirribonucleico
DNAc – Ácido desoxirribonucleico complementario
DUOX – Oxidasa dual
EGC – Enfermedad granulomatosa crónica
EGF – Factor de crecimiento epidérmico
EGF-A – Dominio A del factor de crecimiento epidérmico
FBS – Suero fetal bovino
FXR – Receptor X farnesiloide
G91phox – Subunidad g91phox de NADPH oxidasa
GM-CSF – Factor estimulante de colonia de granulocitos y macrófagos
H ₂ DCFA – Diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína
H ₂ O ₂ – Peróxido de hidrógeno
HDL – Lipoproteína de alta densidad
HE – Hidroetidina
HMGCR – Hidroxi-metil-glutaril-coenzima A reductasa
HNF-1 α – Factor nuclear 1 α de hepatocito

ICAM-1 – Proteína de adhesión intercelular
IFN γ – Interferón gamma
IL-10 – Interleucina 10
IL-1b – Interleucina 1b
IL-4 – Interleucina 4
KO – Knock out
LDL – Lipoproteína de baja densidad
LDL-R – Receptor de LDL
LOX1 – Receptor de LDL oxidadas parecido a lectina
LPS – Lipopolisacárido
LXR – Receptor X hepático
M-CSF – Factor estimulante de colonia de macrófagos
M1 – Macrófago M1
M2 – Macrófago M2
MCP-1 – Proteína quimioatrayente de monocitos 1
NF-kB – Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NO $^{\circ}$ – Óxido nítrico
NOS – Óxido nítrico sintasa
NOX – NADPH oxidasa
NOXA1 – Proteína activadora de NOX1
NOXO1 – Proteína organizadora de NOX1
O $_2^{\circ}$ – Anión superóxido
ONOO $^-$ – Peroxinitrito
PBS – Tampón fosfato salino
PCSK9 – Pro-proteína convertasa subtilisina/kexina de tipo 9
PDGF – Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PMA – Formol-miristato-acetato
PPAR – Receptores activados por proliferadores de peroxisomas
PRR – Receptor de reconocimiento de patrones
RNA – Ácido ribonucleico

ROS – Especies reactivas de oxígeno
SiRNA – Silencing RNA
SOD – Superóxido dismutasa
SR-A ₁ – Receptor <i>scavenger</i> A ₁
SR-A ₂ – Receptor <i>scavenger</i> A ₂
SREBP – Proteínas de unión a elementos reguladores de esteroides
TGFβ – Factor de crecimiento β
TNFα – Factor de necrosis tumoral α
VCAM-1 – Proteína de adhesión celular 1
VLDL – Lipoproteína de muy baja densidad
VSMC – Células de músculo liso vascular
WT – Wild type

Introducción

Introducción

Aterosclerosis

La aterosclerosis es una enfermedad inmunoinflamatoria y fibroproliferativa de las grandes y medianas arterias caracterizada por lesiones focales que ocurren en zonas de alteración del flujo laminar, particularmente en puntos de ramificación y bifurcación, las cuales se caracterizan por presentar acúmulo de lípidos. Las células endoteliales, los leucocitos y el músculo liso vascular son los principales partícipes en el desarrollo de esta enfermedad. Es por mucho la causa más frecuente de enfermedad arterial coronaria, enfermedad de las arterias carótidas y de la enfermedad arterial periférica¹. La aterosclerosis por sí sola rara vez es fatal; es la trombosis formada sobre la ruptura de una placa aterosclerótica, la que precipita los eventos clínicos que amenazan la vida como el síndrome coronario agudo y el ictus.

De entre los adultos en países industrializados, la cuarta parte de todas las muertes resultan del bloqueo arterial debido a placas de aterosclerosis². En el transcurso de 50 años, la prevalencia de la enfermedad se ha incrementado a escalas epidémicas. Resulta sorprendente que los eventos coronarios fueran reconocidos hace apenas cien años.

Antecedentes

Las placas ateroscleróticas en la superficie de la aorta fueron descritas por patólogos alemanes en el siglo XIX³. La palabra aterosclerosis deriva del griego *atheros* que significa gruel, alimento básico de los antiguos griegos, que consistía en algún tipo de cereal (avena, trigo, centeno o arroz) cocido en agua o leche. Esto describiría la consistencia caseosa de las placas al ser diseccionadas. La primera pista de que esa sustancia caseosa era el colesterol llegó en 1910 cuando Aldof Windaus encontró que las placas en las aortas humanas contenían hasta 25 veces más colesterol que en aortas normales.

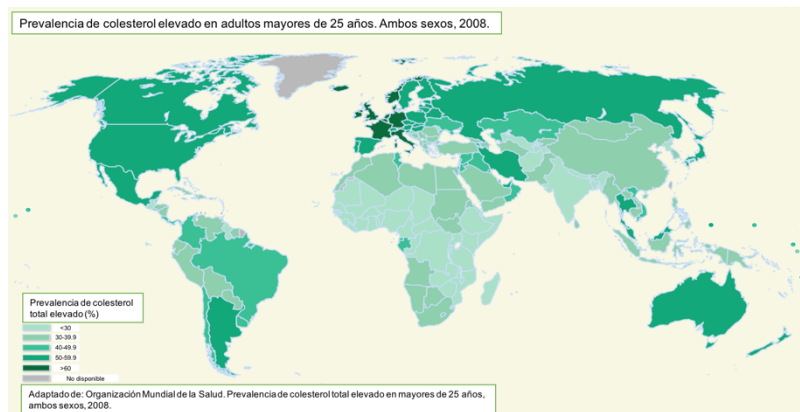


Figura 1. Prevalencia de colesterol total alto (>200mg/dl) en sangre en adultos mayores de 25 años en el mundo. Las tasas más altas se observan en los países con mayor industrialización⁴.

La relación entre los niveles plasmáticos de colesterol y los eventos cardiacos se vinculó genéticamente en 1938, cuando el médico noruego Carl Müller describió a familias en las que el colesterol alto en plasma era transmitido de forma autosómica dominante⁵. Nombrada como hipercolesterolemia familiar, pronto fue reconocida por los niveles altos de colesterol y su asociación con la incidencia hasta 20 veces mayor de eventos cardiacos a mediana edad.

En 1955, John Gofman utilizó la recién desarrollada ultracentrífuga para separar las lipoproteínas transportadoras de colesterol en el plasma de acuerdo a su densidad. Observó dos grandes fracciones: las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y las lipoproteínas de alta densidad (HDL). Posteriormente observó que los pacientes con ataques agudos al corazón presentaban niveles elevados de LDL y bajos de HDL⁶. Las observaciones de Gofman fueron ampliamente replicadas y marcó una de las más grandes correlaciones conocidas en la medicina: niveles altos de LDL, bajos de HDL y mayor incidencia de eventos cardiacos.

Cada partícula de LDL contiene aproximadamente 1500 ésteres de colesterol en un núcleo hidrofóbico rodeado de una membrana fosfolipídica y una proteína llamada apolipoproteína B (ApoB).

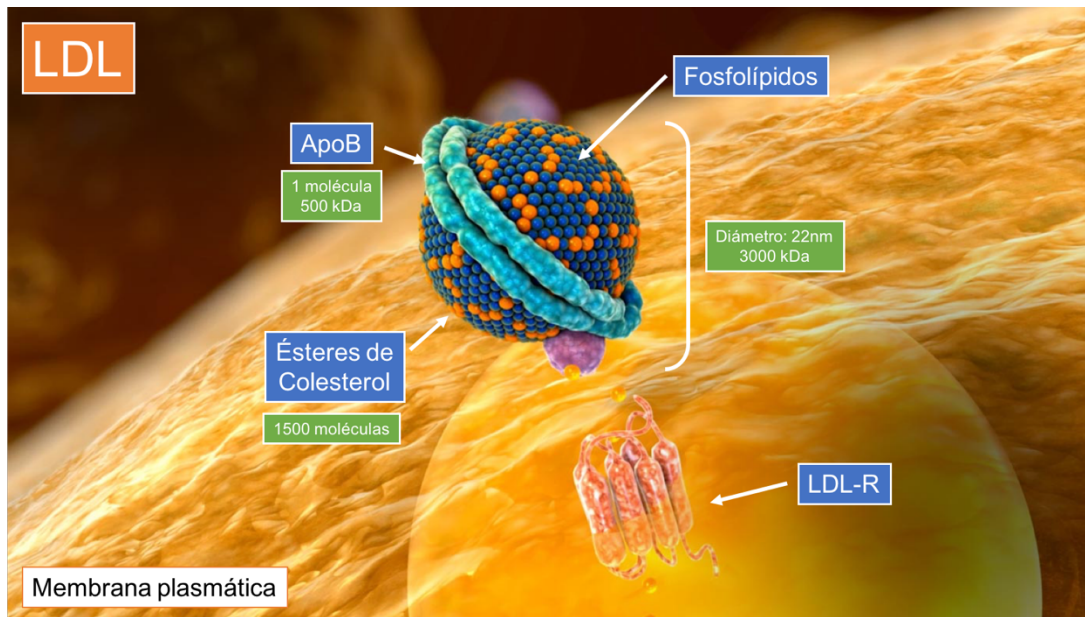


Figura 2. Partícula de LDL. La LDL consiste en un núcleo de ésteres de colesterol (~1500 moléculas) rodeados por una capa de fosfolípidos y unida sobre ella la apolipoproteína B (500kDa), la cual se une al receptor de LDL en la superficie de la membrana plasmática.

Factores de riesgo como la hipertensión, la diabetes, el tabaquismo y el género masculino parecen acelerar la enfermedad desencadenada por las lipoproteínas aterogénicas⁷.

En 1972, Goldstein y Brown descubren el receptor de LDL (LDL-R) estudiando a pacientes con hipercolesterolemia familiar. El LDL-R se une a la apolipoproteína B del LDL y se internaliza por medio de endocitosis mediada por vesículas de clatrina^{8,9}.

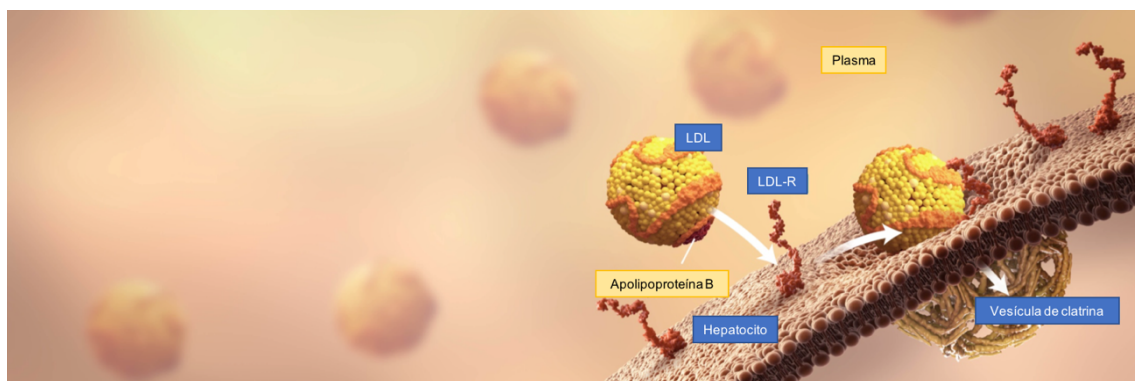


Figura 3. Endocitosis de colesterol mediada por vesículas de clatrina⁹.

El complejo LDL/LDL-R internalizado se separa, donde el LDL-R se recicla y dirige a la membrana celular y el LDL es trasladado a los lisosomas donde los ésteres de

colesterol son hidrolizados y el colesterol libre ejerce estos efectos en la célula: la síntesis de nueva membrana celular, la inhibición de la síntesis endógena de colesterol intracelular, la inhibición de la síntesis de receptores de LDL y la activación de la acetil-coenzima A acetil-transferasa (ACAT) para la re-esterificación del colesterol¹⁰.

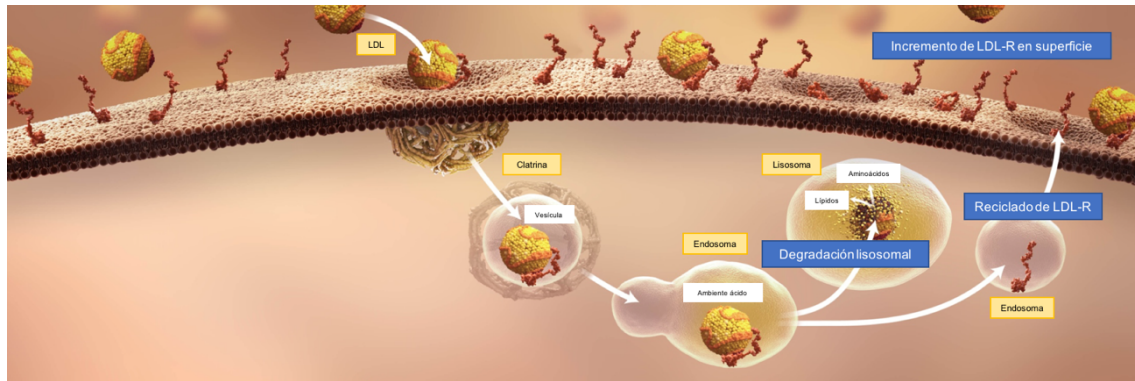


Figura 4. Endocitosis de LDL mediada por el LDL-R¹¹.

La relación entre la producción y actividad del LDL-R y la hidroximetilglutaril-coenzima A reductasa (HMGCR), enzima limitante para la síntesis endógena de colesterol, está sometida a una retroalimentación por inhibición. Cuando los niveles de colesterol son bajos, los niveles de HMGCR y LDL-R aumentan. Cuando los niveles celulares de colesterol aumentan, estas proteínas disminuyen. El resultado es mantener los niveles constantes de colesterol en la célula¹². La regulación de estos eventos depende del factor de transcripción proteínas de unión a elementos reguladores de esteroides o *sterol regulatory element-binding proteins* (SREBP), el cual monitoriza los niveles intracelulares de colesterol libre y modula la expresión de genes reguladores¹³.

En 1976, Akira Endo y colaboradores en Tokio identificaron el primer inhibidor de la HMGCR¹⁴, inaugurando una nueva clase de fármacos que inhibirían la síntesis endógena de colesterol y aumentaría la expresión de LDL-R en superficie, las estatinas.

Fisiopatología de la aterosclerosis

La respuesta inflamatoria que deriva de la retención de lipoproteínas ApoB en la vasculatura induce una activación del endotelio en un modo que recluta la llegada de

monocitos circulantes^{15,16}. Las células endoteliales secretan quimioatrayentes o quimioquinas, que interactúan con receptores presentes en los monocitos y promueven una migración direccional de estos.

Las apolipoproteínas B son producidas por el hígado y las células intestinales. Las ApoB hepáticas son secretadas como lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), las cuales se convierten en la circulación en LDL, y las ApoB intestinales son secretadas como quilomicrones los cuales se convierten por lipólisis en remanentes de quilomicrones.

Los monocitos se originan de células progenitoras derivadas de la médula ósea y circulan el torrente sanguíneo hasta ser atraídos a sitios de inflamación. Conducidos por el factor estimulante de colonia de macrófagos (M-CSF) y otros factores de diferenciación, la mayoría de los monocitos en las lesiones ateroscleróticas se convierten en macrófagos o células dendríticas^{17,18}.

Cascada de adhesión

Los pasos que modulan la entrada de monocitos en la íntima arterial dependen de la regulación de moléculas en el endotelio activado y median el arresto de los monocitos por la *cascada de adhesión*¹⁹. La *captura* y el *rolling* de esta cascada depende de la inmovilización de quimioquinas, particularmente CC-ligando de quimioquina 5 (CCL5) y CXC-ligando de quimioquina 1 (CXCL1), en la superficie luminal del endotelio. La proteína de adhesión celular vascular (VCAM-1) y la de adhesión intercelular (ICAM-1), contribuyen a la adhesión de monocitos. La *transmigración* de monocitos a través del endotelio es mediada por quimioquinas secretadas por las células endoteliales, los macrófagos ya presentes en la íntima y las células de músculo liso vascular. Aunque se han identificado muchas, las principales quimioquinas implicadas en la transmigración de monocitos son la proteína quimioatrayente de monocitos (MCP-1), el CC-receptor de quimioquinas tipo 2 (CCR2), CX3C-receptor y ligando de quimioquina tipo 1 (CX3CR1-CX3CL1), entre otros²⁰.

Captura de lipoproteínas

Aunque los macrófagos pueden aclarar las lipoproteínas ApoB a través del LDL-R, la expresión de este receptor disminuye por el incremento del colesterol intracelular, por lo que deben existir otras vías y mecanismos de entrada de estas lipoproteínas. Se han

identificado distintas modificaciones de las LDL que facilitan la carga de colesterol en los macrófagos *in vitro*²¹. Un paradigma que prevalece ha sido que el incremento en el estrés oxidativo en la pared arterial promueve la modificación de las LDL. Una variedad de mecanismos mediados por enzimas como la 12/15 lipo-oxigenasa y mieloperoxidasa, así como las especies reactivas de oxígeno (ROS) como el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), el peróxido de hidrogeno (H_2O_2) y el óxido nítrico (NO^{\bullet}) han sido identificados como promotores de la oxidación del LDL en la pared arterial²¹ y estas LDL oxidadas son ávidamente endocitadas por los macrófagos en ensayos *in vitro*^{22,23}.

Receptores Scavenger

Los receptores *scavenger* (barrendero), son un tipo de receptor de reconocimiento de patrones (PRR) expresados en macrófagos, con un importante papel en la aterosclerosis caracterizados por su habilidad para reconocer y procesar partículas de LDL modificada²⁴. Numerosos receptores *scavenger* se han clasificado, como el receptor *scavenger* A1 (SR-A1), la translocasa de ácidos grasos o receptor *scavenger* B3 (CD36), el receptor de macrófagos con estructura de colágeno o MARCO (SR-A2), el receptor de LDL oxidadas parecido a lectina (LOX1), entre otros, los cuales pueden unirse a LDL modificadas y promover una sobrecarga de lípidos en los macrófagos, signo característico que les confiere el nombre de células espumosas²⁵.

SR-A1 y CD36 median el 75-90% de la degradación de las LDL que han sido modificadas por acetilación u oxidación en ensayos *in vitro*²³.

Estos receptores internalizan a las lipoproteínas y, en los compartimentos endosomales tardíos, los ésteres de colesterol de esas lipoproteínas son hidrolizados a colesterol libre y ácidos grasos libres.

La deficiencia combinada de SR-A1 y CD36 redujo la formación de células espumosas en ratones *Apoe*^{-/-}; sin embargo, este efecto fue incompleto, el cual sugiere que existen mecanismos adicionales de captura del colesterol *in vivo*^{26,27}.

Diversos estudios proponen que la entrada de colesterol puede ser independiente de estos receptores²⁸. Los macrófagos pueden capturar partículas nativas y oxidadas de LDL por pinocitosis²⁹ así como capturar agregados de lipoproteínas por fagocitosis³⁰.

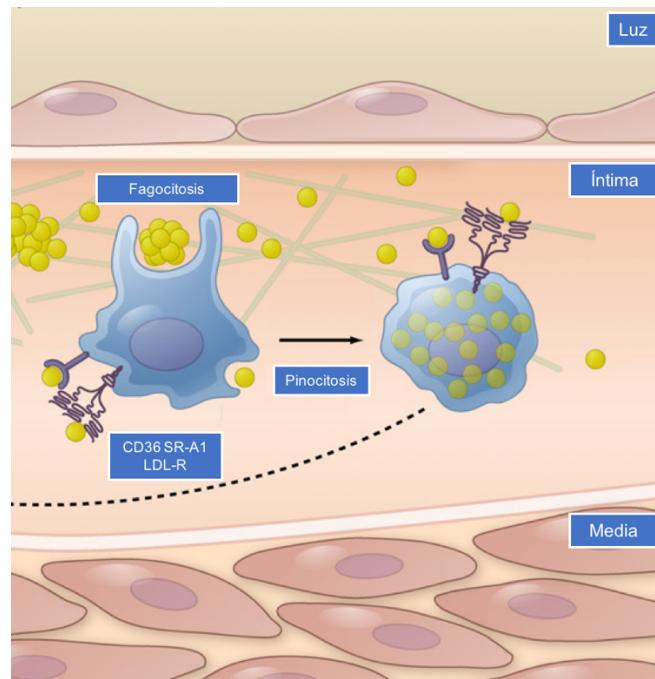


Figura 5. Captura de lipoproteínas apoB por los macrófagos. Diversos mecanismos de captura como la pinocitosis, fagocitosis o la endocitosis mediada por receptores participan en el aclaramiento de lípidos por los macrófagos en la lesión vascular²⁹.

Progresión de la lesión aterosclerótica

Una vez establecidos, los macrófagos que se acumulan en las placas ateroscleróticas parecen tener disminuida su capacidad de migrar, lo que contribuye al fallo en la resolución de la inflamación y las lesiones se vuelven más avanzadas: placas complejas en las que otros subtipos celulares como las células dendríticas, los linfocitos, eosinófilos, mastocitos y células de músculo liso vascular empeoran el proceso inflamatorio^{31,32}.

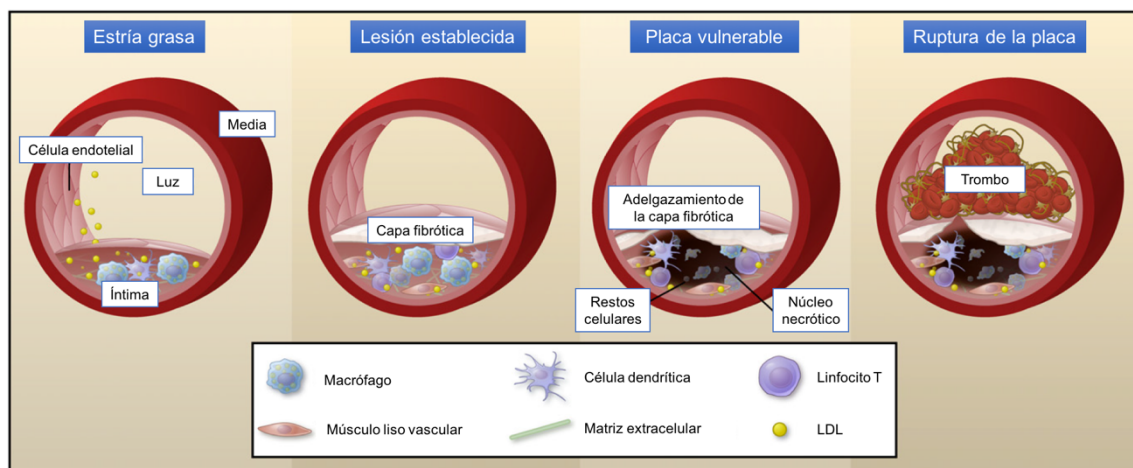


Figura 6. Etapas en la progresión de la lesión aterosclerótica³³.

En estas placas avanzadas, además de su función *scavenger*, los macrófagos continúan siendo los mayores promotores de la respuesta inflamatoria a través de la secreción de mediadores pro-inflamatorios que incluyen citoquinas como TNF- α e IL-1 β , especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, así como moléculas desestabilizantes y pro-trombóticas como proteasas de matriz extracelular y finalmente su muerte por necrosis o apoptosis. La eferocitosis (*efferocytosis* del latín '*efferre*' que significa 'llevar a la tumba') es la capacidad de los macrófagos de fagocitar a las células apoptóticas y necróticas, dicha capacidad es deficiente en los estadios avanzados de la lesión³⁴. Finalmente, los macrófagos que mueren liberan el contenido lipídico y los factores tisulares que desencadenan la formación un núcleo necrótico frágil, avascular, hipocelular y totalmente desprovisto de soporte de colágeno. Este núcleo necrótico es un componente clave que contribuye a la ruptura de la placa y la consiguiente trombosis que subyace al infarto agudo al miocardio y al ictus.

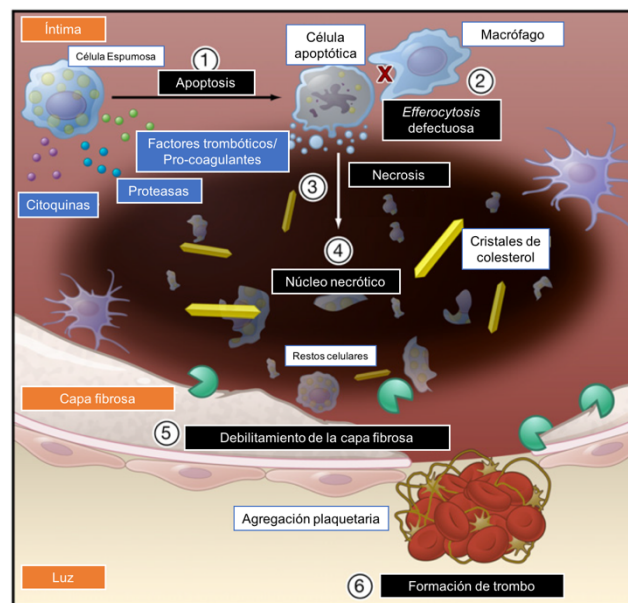


Figura 7. Desestabilización de la placa y trombosis. La apoptosis de las células espumosas y la eferocitosis defectuosa de los macrófagos presentes en la placa promueve un aumento de muerte por necrosis en estas células las cuales conforman el núcleo necrótico. El posterior debilitamiento de la placa aumenta el riesgo de ruptura y la siguiente formación del trombo que ocluye al vaso sanguíneo³³.

Por el otro lado, bajo condiciones favorables (bajos niveles de LDL y altos de HDL), se puede reducir el contenido de colesterol intracelular en los macrófagos

transportándolo hacia las lipoproteínas HDL extracelulares, a través de transportadores de membrana, mecanismo conocido como transporte reverso del colesterol^{35,36}.

Polarización de macrófagos

Existe un gran interés en la heterogeneidad de los macrófagos en las lesiones ateroscleróticas, particularmente por su capacidad de diferenciarse a distintas subpoblaciones: aquellas involucradas en los procesos inflamatorios, conocidos como macrófagos M1 y aquellas que participan en la resolución y reparación de los tejidos afectados, los macrófagos M2^{37,38}. Mucha de la teoría en esta área ha sido desarrollada por estudios *in vitro* que exploran la expresión de genes y proteínas y la función de los macrófagos a varios tratamientos como los factores de crecimiento y diferenciación, las citoquinas producidas por respuestas tipo 1 o 2 de las células T cooperadoras, factores de transcripción PPARs e incluso lipoproteínas aterogénicas y lípidos en general³⁹. Sin embargo, la situación que acontece en el subendotelio aterosclerótico es más compleja y existe una gran diferencia entre los estudios *in vitro* y las observaciones *in vivo*. Se necesitan más estudios para caracterizar las moléculas específicas que influyen en la polarización de los macrófagos y que tengan significancia funcional en el desarrollo de aterogénesis más allá diferenciación entre M1 y M2⁴⁰⁻⁴².

PCSK9

Pro-proteína convertasa subtilisina/kexina de tipo 9 (PCSK9) es una glicoproteína compuesta por 692 aminoácidos, perteneciente a la familia de las pro-proteínas convertasas⁴³.

Es expresada no sólo en el hígado, sino también en intestino, riñón y sistema nervioso central⁴⁴. PCSK9 es sintetizada como un zimógeno soluble (pro-PCSK9) de 72 kDa, compuesto por un péptido señal (residuos 1-30), un pro-dominio (residuos 31-152) que preceden al dominio catalítico (residuos 153-451) y que finaliza por el dominio C-terminal (residuos 452-692). Este zimógeno es autocatalizado en el retículo endoplásmico, dando lugar a su estructura madura de 62 kDa, la cual se transporta al aparato de Golgi para luego ser secretada⁴⁴. Una vez secretada al plasma, la PCSK9 extracelular actúa como una proteína de tipo chaperona e interactúa con la primera secuencia repetitiva del factor de crecimiento epidérmico (EGF-A) del LDL-R, que se

encuentra presente en la membrana plasmática de los hepatocitos. Esta actividad de tipo chaperona es responsable de la degradación del LDL-R mediada por PCSK9⁴⁵. El complejo PCSK9/LDL-R es internalizado en el hepatocito a través de endocitosis mediada por clatrina, para luego ser trasladado hacia los lisosomas, donde una disminución del pH fortalece más la interacción entre ambas proteínas. La unión entre PCSK9 y LDL-R inhibe el reciclado del LDL-R hacia la membrana plasmática, reduciendo así la cantidad de LDL-R en la membrana del hepatocito y en consecuencia elevando los niveles plasmáticos de colesterol⁴⁶.

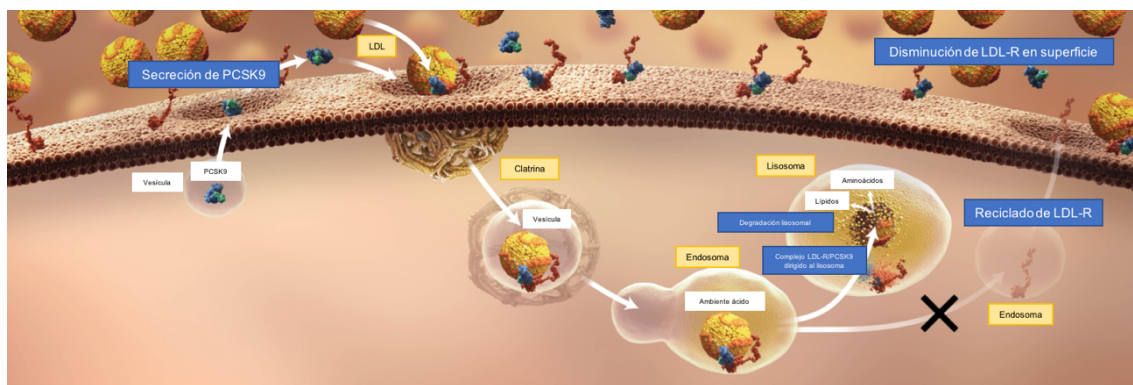


Figura 8. PCSK9 y LDL-R en el hepatocito. La unión de PCSK9 al LDL-R impide el reciclamiento de LDL-R, disminuyendo la cantidad de receptor en membrana y la capacidad de aclaramiento de LDL plasmático por el hígado⁴⁷.

La importancia clínica de PCSK9 derivó a partir de la caracterización de la hipercolesterolemia familiar autosómica dominante de tipo III, por la mutación con aumento en la actividad de PCSK9, observada en familias francesas y que carecían de mutaciones en el receptor de LDL-R (hipercolesterolemia familiar tipo I) y en la apolipoproteína B (hipercolesterolemia familiar tipo II)⁴⁸. El rol que PCSK9 ejercía en el metabolismo del colesterol se intensificó al descubrir que las mutaciones con la pérdida en la función manifestaban una importante hipocolesterolemia. De este modo, se determinó que las variantes con pérdida en la función de PCSK9 disminuían los niveles de LDL en sangre al disminuir la degradación del LDL-R y que las variantes con ganancia en la función incrementaban los valores de LDL al acelerar la degradación del LDL-R⁴⁹.

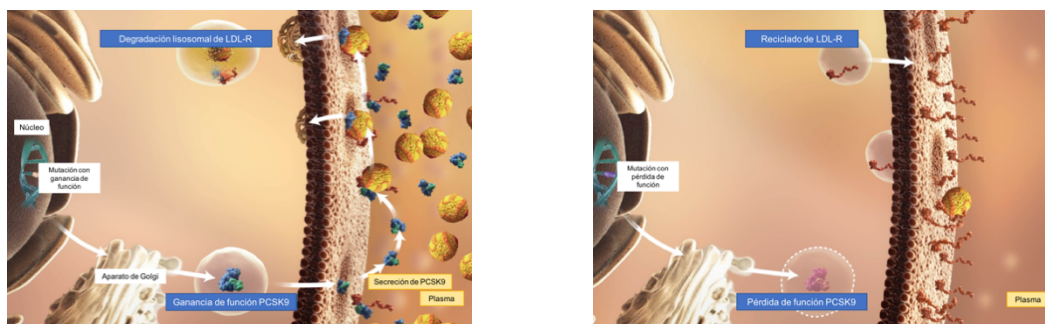


Figura 9. Mutaciones en PCSK9. Aquellas mutaciones que confieren mayor actividad y función de PCSK9 disminuyen considerablemente la cantidad de LDL-R. Por el contrario, las mutaciones con pérdida en la función de PCSK9 permiten una cantidad abundante de LDL-R en la superficie del hepatocito.

El plasma humano contiene ~100-200 ng/ml de PCSK9⁵⁰. Estudios en animales transgénicos indican que sólo las modificaciones que sobreexpresan PCSK9 a niveles supra-fisiológicos (>30 veces) incrementan los niveles plasmáticos de colesterol (+60%); un aumento de PCSK9 de 3 veces por encima de estos valores no tiene un impacto significativo en el colesterol circulante^{51,52}.

También, la infusión continua de PCSK9 en ratones WT con PCSK9 recombinante⁵³ mostró que la administración de 1 microgramo por mililitro de sangre circulante es necesaria para afectar los niveles proteicos de LDL-R en el hígado. Por lo tanto, incluso a niveles elevados, la PCSK9 circulante reduce principalmente los niveles de LDL-R en el hígado con pocos cambios en tejidos extrahepáticos, por ejemplo, en las glándulas suprarrenales^{52,54}.

La regulación transcripcional de PCSK9 ha sido cada vez más entendida en los últimos años. El principal factor de transcripción que regula la expresión de PCSK9 es SREBP⁴⁵, mismo que regula al LDL-R e HMGCR. La inhibición de HMGCR por las estatinas ocasiona una inhibición de síntesis endógena de colesterol, acompañado de una sobreexpresión de LDL-R y, de manera paradójica, una sobreexpresión de PCSK9. Esto explica los casos refractarios de pacientes que toman estatinas^{45,55}. De manera subsecuente, se ha descrito que el factor nuclear 1 α de hepatocito (HNF-1 α) también interviene en la regulación transcripcional de PCSK9 en el hígado⁵⁶. Así mismo, la participación de receptores nucleares como el receptor X farnesoide (FXR), el receptor

X hepático (LXR) y los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs)⁵⁷⁻⁵⁹.

La aterosclerosis y la inflamación crónica que la caracteriza, parece tener más relación con PCSK9 más allá que sólo la vía del receptor de LDL y los niveles de LDL circulantes⁶⁰. Sin embargo, los hallazgos y las descripciones son opuestas entre los pocos reportes que existen. Ferri *et al.* ha descrito la expresión de PCSK9 en placas ateroscleróticas⁶¹ y Pesu *et al.* lo refuta y describe la presencia de otra proteasa en la placa de aterosclerosis⁶². PCSK9 es secretada también por las células musculares vasculares y reducen la expresión del LDL-R en macrófagos⁶¹. En ratones, la administración de lipopolisacárido (LPS) y la inflamación sistémica que induce provoca la expresión de ARNm de PCSK9 y la disminución de LDL-R en hepatocitos⁶⁰, lo que influye significativamente en los niveles plasmáticos de LDL durante la inflamación. De igual modo lo ocasiona la trementina y las partículas de zimosano⁶³. Un estudio describe la inhibición de la activación del factor nuclear kappa B (NF-κB) ocasionada por LDL oxidadas en macrófagos, utilizando un *siRNA* de PCSK9 y, por consiguiente, modificando la expresión de citoquinas pro-inflamatorias⁶⁴.

Estrés Oxidativo

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) juegan un papel importante en el desarrollo de aterosclerosis. La producción de ROS a nivel vascular participa tanto en el desarrollo de la enfermedad como en el mantenimiento de la propia homeostasis. En la vasculatura, diversas enzimas localizadas contribuyen a la producción de estas especies. Éstas incluyen a las oxidasas de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato o NADPH oxidasas (NOX), sintasas de óxido nítrico (NOS), enzimas de la cadena respiratoria, la monooxigenasa del citocromo P₄₅₀ y xantina oxidasa^{65,66}. Mientras todas estas enzimas son importantes en varios estados de la enfermedad, las NOX parecen tener un rol principal al orquestar la activación y la disfunción de otras enzimas⁶⁷.

La generación inicial de anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) por las NADPH oxidasas desencadena la liberación de ROS de otras fuentes como la producción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) por la superóxido dismutasa (SOD) y la también producción de peroxinitritos ($ONOO^-$) por la unión del superóxido al óxido nítrico (NO^{\bullet}) producido por la óxido nítrico sintasa⁶⁸. Las diferentes isoformas de NOX se expresan diferencialmente en la pared

vascular, incluyendo el endotelio, las células del músculo liso vascular, fibroblastos y las células inmunes infiltradas.

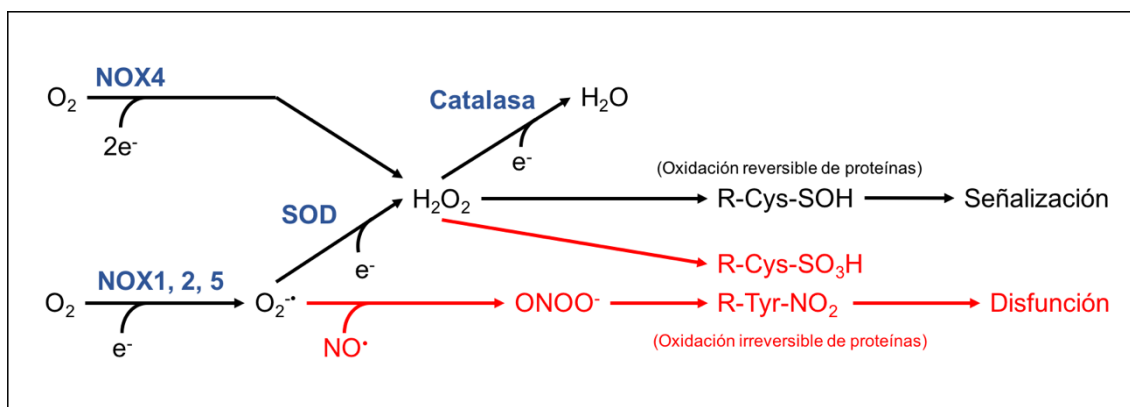


Figura 10. Producción de ROS y enzimas participantes. Las NOX son las enzimas encargadas de iniciar la producción de ROS. El anión superóxido puede generar peróxido de hidrógeno así como peroxinitritos. La acción de estas moléculas, además de su función bactericida, es la participación en la oxidación reversible de proteínas que pueden iniciar cascadas de señalización. No obstante, cuando la producción se sobrepasa, la oxidación de proteínas puede ser irreversible y generar daño y disfunción celular⁶⁹.

El perfil de expresión de las NOX varía tanto en la enfermedad como en los distintos estadios de la misma. En general, es aceptado que en condiciones fisiológicas, las NOX presentan una actividad constitutiva relativamente baja. Sin embargo, su actividad puede verse aumentada en respuesta a diferentes estímulos⁷⁰⁻⁷².

Localización, estructura y funciones básicas de las principales NOX vasculares

Las isoformas vasculares de NOX tienen seis dominios transmembrana, incluyendo hélices alfa con terminales N- y C- citosólica, las cuales participan en la transferencia de electrones, que llevan a la reducción del oxígeno molecular hacia el anión superóxido. El flujo de electrones y la producción de ROS es estrictamente controlada por la interacción de las subunidades NOX con otras proteínas, la fosforilación de algunas subunidades de ellas o la elevación del calcio intracelular⁷³. Existen siete isoformas de NOX expresadas en los mamíferos: NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1 y DUOX2. Cuatro (NOX1, NOX2, NOX4 y NOX5) son las más comúnmente expresadas en células vasculares, mientras que otros homólogos se expresan a niveles muy bajos.

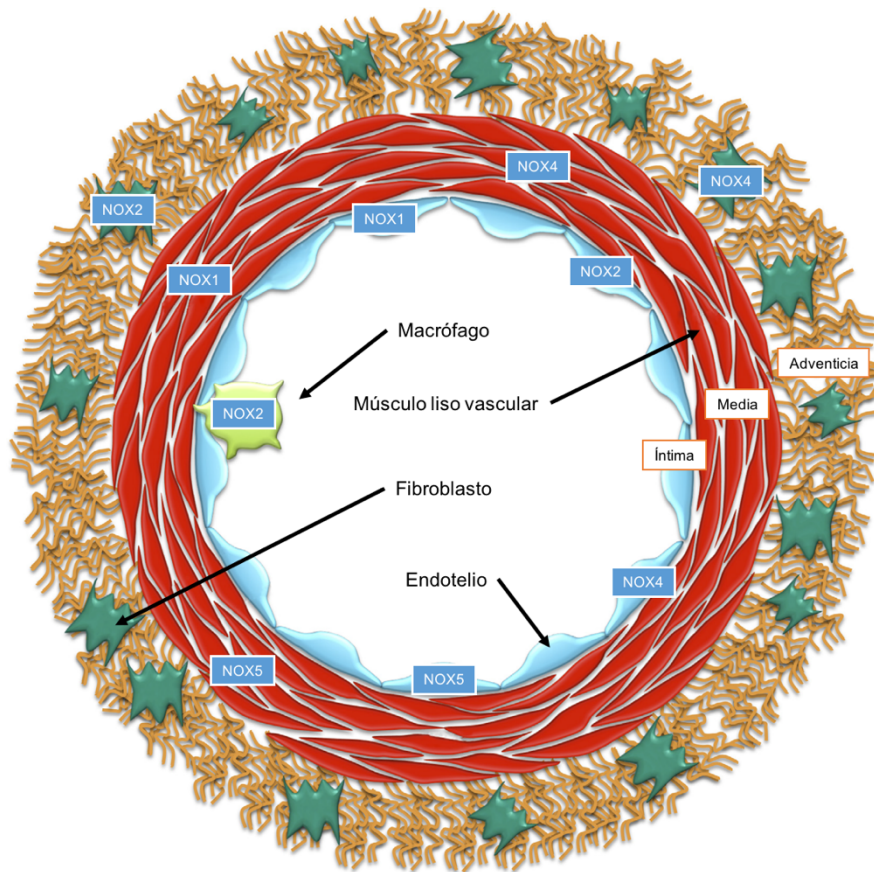


Figura 11. Expresión de NOX en tejidos vasculares⁷⁴.

NOX₂

Inicialmente llamada G91phox, ha sido clonada e identificada como oxidasa de la respiración fagocítica, crítica para la defensa del huésped inicial. Además de en los macrófagos, es la isoforma vascular más expresada de todas. Se expresa en músculo liso vascular, fibroblastos de la adventicia, células endoteliales y en adipocitos perivasculares⁷⁵⁻⁷⁷. La estructura de NOX₂ en las células vasculares es similar a la encontrada en los macrófagos, aunque puede tener subunidades reguladoras adicionales en condiciones especiales. En particular, la proteína organizadora de NOX₁ (NOXO1) y la proteína activadora de NOX₁ (NOXA1) inicialmente descubiertas como reguladoras de NOX₁, pueden tener propiedades activadoras hacia NOX₂⁷⁸. En células endoteliales, NOX₂ participa en la regulación de numerosas funciones. Por ejemplo, la activación de NOX₂ afecta la biodisponibilidad del NO[•], y modula la expresión de moléculas de adhesión durante la inflamación y angiogénesis⁶⁸. En los macrófagos, NOX₂ es crucial para la función antimicrobiana de estas células así como en la regulación de la inflamación⁷⁹. La enfermedad granulomatosa crónica (EGC) es

ocasionada por un defecto hereditario en el que NOX2 es deficiente en la producción de especies reactivas de oxígeno por los macrófagos, lo que expone a estos pacientes a infecciones bacterianas y fúngicas que ponen en riesgo la vida⁸⁰.

Mecanismos de activación y regulación de las NOX vasculares

A pesar de las similitudes en su estructura, los homólogos de las NOX vasculares tienen diferentes mecanismos de activación. La activación así como sus consecuencias pueden ser diferentes en el endotelio, en las células del músculo liso vascular o en los macrófagos. NOX1 y NOX2 requieren la asociación de componentes citosólicos; NOX4 es activa constitutivamente y NOX5 es activada por una elevación del calcio intracelular Ca^{2+} ⁸¹.

La activación sostenida de las NOX ocurre en respuesta a numerosos estímulos. Las NOX responden a múltiples factores de crecimiento como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento beta ($\text{TGF-}\beta$), citoquinas como $\text{TNF-}\alpha$, IL-1 y el factor de agregación plaquetaria. Fuerzas mecánicas y factores metabólicos como la hiperglucemia y productos avanzados de la glicosilación, así como receptores acoplados a proteínas G como la serotonina, trombina o angiotensina II también pueden activar a las NOX^{73,82-86}.

La regulación del estado redox por la activación de las NOX provee tanto retroalimentación negativa como regulación positiva. El mecanismo autolimitante predomina durante condiciones fisiológicas para mantener un grado bajo de actividad en las NOX de los macrófagos. Sin embargo, la activación sostenida de estas enzimas en ellos podría tener un papel determinante en la evolución de la enfermedad aterosclerótica.

Hipótesis y Objetivos

Hipótesis y Objetivos

Partiendo de los antecedentes anteriormente descritos, dada la implicación que PCSK9 ejerce sobre la homeostasis lipídica, la modulación que la inflamación ejerce sobre la expresión de esta proteína, la participación de los macrófagos en el desarrollo de la enfermedad aterosclerótica, así como los escasos reportes que han sido realizados en este tipo celular, nuestro objetivo central es conocer y entender el papel de PCSK9 en el metabolismo y fisiología del macrófago, en el contexto del desarrollo de aterosclerosis. A partir de esta formulación, la hipótesis de trabajo que manejamos es que el macrófago puede participar en una regulación intercelular mediada por PCSK9, cuyos efectos en la iniciación de la formación de la placa, su desarrollo y estabilización, así como en la expresión de receptores implicados en eventos aterotrombóticos ofrecen un nuevo campo de estudio para comprender mejor la patología aterogénica. Para ello nos planteamos los siguientes objetivos:

- Analizar la expresión de PCSK9 en tejidos vasculares
- Estudiar el efecto de PCSK9 sobre el LDL-R en el macrófago
- Evaluar el perfil funcional del macrófago bajo influencia de PCSK9 en términos de viabilidad, fagocitosis, producción de ROS, expresión de genes
- Estudiar en muestras vasculares humanas la expresión de PCSK9

Material y Métodos

Material y Métodos

Ética

Sangre periférica

La sangre humana proveniente de donadores sanos fue adquirida del Banco de Sangre de la Comunidad de Madrid siguiendo los protocolos de traslado y cumplimentando los correspondientes consentimientos informados de los donadores. Los paquetes de sangre se obtuvieron en colaboración con el Dr. José Luis Rodríguez Fernández del Centro de Investigaciones Biológicas de Madrid y el Dr. Eduardo López-Collazo del Instituto de Investigación del Hospital La Paz.

Suero de pacientes sanos e hipercolesterolémicos

Muestras de suero de pacientes previamente diagnosticados como hipercolesterolémicos y sueros controles sanos fueron cedidas del Banco de Sueros por el Dr. Guillermo Sáez Tormo, jefe del Servicio de Análisis Clínicos del Hospital Universitario Dr. Peset Alexandre de la Universidad de Valencia.

Arterias Femorales

Pacientes del Hospital Universitario La Paz con diagnóstico de enfermedad vascular periférica y con indicación de amputación del miembro inferior fueron informados y consintieron la donación de una sección de la arteria femoral superficial del miembro amputado para su análisis. La obtención de las muestras anatómicas se realizó en colaboración con el Dr. Luis Riera del Moral, cirujano del Servicio de Cirugía Vascular del hospital.

Ratones

Ratones CD57Bl/6J WT y *Ldl-r* KO (*Ldl-r*^{-/-}) fueron cedidos por el Dr. Vicente Andrés del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC). Los ratones fueron adquiridos del Jackson Laboratories y mantenidos en salas bajo condiciones programadas de luz/oscuridad, libres de patógenos y alimentados con pienso y agua *ad libitum*.

El presente estudio recibió la aprobación por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario La Paz con el siguiente código de aprobación: HULP PI-2362.

Muestras Humanas

Arterias Femorales

La obtención de las muestras anatómicas se realizó en quirófano al momento de la cirugía. La amputación se realiza a nivel supracondíleo lo que permite obtener la parte distal de la arteria femoral superficial. Realizada la amputación del miembro y la resección de la muestra de aproximadamente 1 cm de longitud, éstas fueron



Figura 12. Resección de arteria femoral.

lavadas rápidamente en PBS para eliminar restos de sangre y se almacenaron a -80°C .

Cultivo Celular y Transfecciones

Cultivo Primario

Macrófagos humanos provenientes de sangre periférica

La sangre entera se coloca sobre un volumen de Ficoll (Ficoll-Plaque Plus; GE Healthcare)⁸⁷ y se centrifuga a 1,800 rpm por 30 minutos a temperatura ambiente.

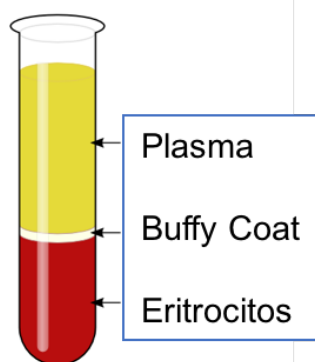


Figura 13. Capa leucocitaria.

Posteriormente se aísla la fracción conocida como '*buffy coat*' o capa leucocitaria, consistente en linfocitos y monocitos y se lava con *buffer* fosfato salino (PBS) para luego lisar los eritrocitos con *buffer* de lisis a base de amoníaco-cloruro-potásico (ACK Lysing Buffer; Gibco™) por 5 minutos a temperatura ambiente, seguido de un lavado adicional con PBS al 1x. Los monocitos fueron sembrados en placas tratadas para células adherentes en medio de cultivo DMEM (Gibco™) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS)

en una atmósfera húmeda al 5% de CO_2 a 37°C . Los monocitos adheridos se mantuvieron en cultivo por 7 a 10 días para permitir la diferenciación a macrófagos⁸⁸.

Macrófagos murinos peritoneales

Ratones C57/Bl6 WT y *Ldl-r* KO fueron sacrificados en cámara de CO₂. Se realiza una disección de la pared abdominal para descubrir el peritoneo y se inyectan 10 ml de medio DMEM. Se agita discretamente el abdomen y se recupera el medio que incluye a los macrófagos del peritoneo⁸⁹. Se centrifuga a 1,200 rpm x 5 minutos, se cuantifica la población de células y se siembran a una densidad de 2×10^6 de macrófagos por pocillo con medio DMEM al 10% de FBS y antibióticos.

Cultivo Secundario

Líneas celulares

THP-1

La línea celular humana de monocitos THP-1 proviene de un paciente masculino de 1 año de edad con diagnóstico de leucemia monocítica aguda. Adquirida de la ATCC #ATCC TIB-202. Se mantuvo en medio DMEM al 10% de FBS y antibióticos. Para diferenciar los monocitos a macrófagos, las células se estimulan con forbol-miristato-acetato (PMA)⁹⁰ a una concentración de 100 nM en el medio y al 2% de FBS durante 24 horas. Posteriormente se lavan las células y se recambia el medio al 10% de FBS. Se mantienen por 48-72 horas para permitir la diferenciación a macrófagos.

HepG2

La línea celular humana HepG2 proviene de un paciente masculino de 15 años de edad con diagnóstico de carcinoma hepatocelular. Adquirida por la ATCC #ATCC HB-8065. Esta línea se mantuvo en medio DMEM al 10% de FBS y antibióticos.

H-MEC

La línea celular H-MEC proviene de la microvasculatura de la piel de un recién nacido. Adquirida en la ATCC (#ATCC CRL-3243), esta línea fue cedida por la Dra. Ana Briones del Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la UAM. Para su mantenimiento en cultivo se requirió el medio MCDB131 suplementado con 10 ng/ml de EGF, 1 µg/ml de hidrocortisona, 10 mM de glutamina y FBS a una concentración final del 10%.

VSMC

La línea de células de músculo liso vascular fue cedida por la Dra. Concha Peiró del Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la UAM. Estas células se obtuvieron de aortas abdominales de donadores de órganos. Las aortas se disgregaron y se seleccionaron las células α -actina positivas para su siembra⁹¹. Se mantuvieron en medio DMEM al 10% de FBS y antibióticos.

Polarización de Macrófagos M1/M2

La polarización de macrófagos a sus distintas poblaciones M1/M2 se realizó utilizando las siguientes citoquinas⁹²:

IL-4 e IL-10 a una concentración de 20 ng/ml durante 24 horas para M2

LPS a una concentración de 100 ng/ml e IFN γ 20 ng/ml durante 24 horas para M1

Así mismo, el empleo de las citoquinas M-CSF para M1 y GM-CSF para M2 a 20 ng/ml por 24 horas en los experimentos indicados⁹³.

Silenciamiento de *LDL-R*

La transfección de macrófagos para silenciar el gen *LDL-R* se realizó utilizando un pool de cebadores *SiRNA* de General Electric Healthcare (DharmaFECT Dharmacon ON-TARGETplus SMARTpool *SiRNA* (3949) L-011073-00-0005) que contiene diferentes secuencias para su silenciamiento⁹⁴. La transfección se corroboró por citometría de flujo y PCR.

Primers <i>SiRNA LDL-R</i> :
GGA CAG AUA UCA UCA ACG A
GAU GAA GUU GGC UGC GUU A
GUG CAU CUC UCG GCA GUU C
GCA AUG ACC UUA AGA UCG G

Generación de Línea Celular HepG2 *PCSK9 KO*

CRISPR/Cas9 es un mecanismo de respuesta inmune usada por arqueas y bacterias para la eliminación de material genético foráneo⁹⁵. Este mecanismo ha sido propuesto para otras funciones, que incluyen la ingeniería genética en mamíferos como la delección de

genes⁹⁶⁻⁹⁸. Los productos de los plásmidos CRISPR/Cas9 permiten la identificación y recorte de genes específicos utilizando secuencias de ARN guía obtenidos de la librería CRISPR Knock-out (GeCKO) desarrollada por el Broad Institute⁹⁹.

La línea celular HepG2 se transfectó con plásmidos adquiridos de Santa Cruz Biotechnology utilizando la técnica CRISPR/Cas9 para su generación con los siguientes reactivos: NARC-1 CRISPR/Cas9 KO Plasmid (h) sc-402445, NARC-1 HDR Plasmid (h) sc-402445-HDR, UltraCruz Transfection Reagent sc-395739, Plasmid Transfection Medium sc-108062, Control CRISPR/Cas9 Plasmid sc-418922, Puromycin dihydrochloride sc-108071

Citometría de Flujo

Especies reactivas de oxígeno (ROS)

La determinación del estrés oxidativo en las células se realizó con el uso de sondas que emiten fluorescencia en presencia de diversos radicales¹⁰⁰. Los radicales libres peroxinitrito y peróxido de hidrógeno se miden con la sonda diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H₂DCF_A) (ThermoFisher). Una vez realizado el ensayo, las células se levantan utilizando un raspador para cultivo celular y se centrifugan a 1,300 rpm x 5 minutos. Se re-suspenden en PBS con FBS al 2% y la sonda H₂DCF_A a una concentración de 10 µM. Se incuba la sonda por 30 minutos, se lava la muestra y se re-suspende en PBS/FBS 2% para a continuación analizarse en el citómetro¹⁰¹. La cuantificación se realiza con la intensidad de señal obtenida.

La sonda hidroetidina (HE) (ThermoFisher) mide el radical superóxido en las células emitiendo un color rojo cuando ésta se oxida¹⁰². Utilizado a una concentración de 10 µM, se realiza el mismo protocolo de incubación y lectura que H₂DCF_A por citometría. La sonda 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoresceína (DAF-2) (ThermoFisher), detecta la producción de óxido nítrico¹⁰³, que al reaccionar con éste emite fluorescencia color verde. Utilizado a una concentración de 1 µM, se emplea la misma incubación y lavados que las sondas previas.

Viabilidad / Apoptosis

La viabilidad celular se determina con el uso de sondas que intercalan con el DNA, lo que supone una afectación de la célula cuando ésta internaliza en la misma¹⁰⁴. La sonda 4',6-diamidino-2-fenilindol, dihidrocloruro (DAPI) (ThermoFisher) se utiliza para discriminar entre células vivas y muertas. La adición de la sonda DAPI en conjunto con otras sondas como las anteriormente descritas en la medición de especies reactivas de oxígeno, permiten analizar específicamente a la población viva y cuantificar la emisión de la sonda exclusivamente de estas células. DAPI se utilizó a una concentración de 3µM, añadido en el paso último a la lectura por el citómetro.

La apoptosis es un proceso genético de muerte celular programada. Este proceso es crítico para el adecuado desarrollo y función del organismo. Existen dos principales mecanismos que activan la apoptosis: la vía extrínseca, mediada por ligandos y la vía intrínseca, activada por daño al ADN, hipoxia, etc.¹⁰⁵, que resulta en la activación de una familia de proteasas, las caspasas. Como consecuencia de esta activación, la cascada proteolítica culmina con la muerte y eliminación de la célula. Cambios morfológicos como fluctuaciones en el tamaño celular, la exposición en la superficie de la membrana de fosfatidilserina y cambios bioquímicos como la pérdida del potencial de membrana, la activación de caspasas entre otros son característicos de la apoptosis¹⁰⁶. La anexina V es un marcador de apoptosis que se une a la fosfatidilserina cuando inicia el proceso apoptótico. El kit de detección de anexina V (BD Pharmingen™) fue utilizado para la detección de apoptosis. Brevemente el protocolo:

Finalizado el tiempo de estímulo, las células se lavan con PBS y se re-suspenden en *binding buffer* 1X a una concentración de 1×10^6 células/ml. Se transfieren 100 µl de la solución (1×10^5) a un tubo de 5 ml. Posteriormente se añaden 5 µl de anexina V y 5 µl de DAPI. Se agita en vórtex y se incuba por 15 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. Finalmente se añaden 400 µl de *binding buffer* 1X a cada muestra y se analiza en el citómetro. Las células DAPI negativas, anexina V positivas indican un estadio inicial de apoptosis; por el contrario, las células DAPI positivas, anexina V positivas sugieren tanto una apoptosis tardía como una muerte por necrosis.

Inmunodetección de proteínas

El marcaje de proteínas de membrana por citometría se utilizó para evaluar la cantidad de LDL-R en macrófagos. Para ello se empleó un anticuerpo monoclonal anti-LDL (#ab52818 Abcam) hecho en conejo. Brevemente: Las muestras se bloquearon con PBS y albúmina de suero bovino (BSA) al 10% para impedir uniones inespecíficas, seguido de la incubación con el anticuerpo por 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron las muestras y se incubaron con un anticuerpo Alexa Fluor® 647 anti-conejo hecho en cabra por otros 30 minutos. Finalmente, después del último lavado, las muestras se re-suspendieron en PBS/FBS 2%, se marcaron con DAPI y se analizaron en el citómetro.

Fagocitosis

Para el ensayo de fagocitosis, utilizamos Zymosan A (*S. cerevisiae*) BioParticles™, Alexa Fluor™ 488 (#Z23373 ThermoFisher), las cuales son partículas de levadura unidas covalentemente a fluoróforos que emiten fluorescencia a 488 nm¹⁰⁷. Brevemente: la cantidad de partículas de zimosano fue de 10 por cada macrófago. Se utilizaron 5x10⁴ macrófagos por condición. Las muestras se re-suspenden y se incuban con las partículas de zimosano por 1 hora a 37°C. Posteriormente se centrifugan a 1,300 rpm x 5 minutos para eliminar las partículas no fagocitadas. Finalmente se resuspenden en PBS/FBS 2% y se analizan en el citómetro.

Microscopía

Inmunofluorescencia

Las células se sembraron en placas de 8 pocillos (Chamber Slides, Falcon®) a una densidad celular de 8x10⁴ por pocillo en 300 µl de medio. Una vez finalizados los estímulos, se aspira el medio de la placa de cultivo y se lava en 3 ocasiones con PBS 1x estéril. Se fijan las células administrando 200 µl de paraformaldehído al 2% durante 10 minutos. Se lava con PBS 1x en 3 ocasiones. Añadimos metanol frío durante 5 minutos. Nuevamente se lavan las muestras con PBS 1x en 3 ocasiones. Se procede a bloquear con albúmina de suero bovino al 3% añadiendo 200 µl a cada pocillo de la placa durante 30 minutos. Se lava con PBS 1x en una ocasión. Posteriormente se incuba el anticuerpo primario durante 18 horas a 4°C. Pasada la incubación, se retira el anticuerpo primario

y se lava con PBS 1x en tres ocasiones. Se añade el anticuerpo secundario (1:1000) por 1 hora a temperatura ambiente. Posterior al anticuerpo secundario se incuba por 20 minutos más con DAPI para teñir núcleos celulares. Finalizado este paso se lava con PBS 1x y se retira el montaje de la placa. Se añaden 5 µl de ProLong® Gold Antifade Reagent (Invitrogen) a cada pocillo y se coloca el cubreobjetos. Se mantiene durante 24 horas a temperatura ambiente para secar y se almacena posteriormente a 4°C aislado de la luz. Las muestras fueron analizadas en un microscopio confocal modelo Espectral Leica TCS SP5 (Leica Microsystems). Las imágenes se adquirieron con el programa informático Leica Application Suite Advanced Fluorescence Lite y se analizaron con el programa ImageJ.

Migración

El ensayo de migración se realizó con el empleo del sistema Cell Observer® de Carl Zeiss. El sistema cuenta con microscopios Axio Observer y Axio Imager de Carls Zeiss, cuenta además con una cámara de incubación que permite mantener a las células en condiciones óptimas de cultivo a temperatura y humedad controladas. Las células fueron mantenidas a 37°C y a 5% de CO₂ durante 48 horas realizándose capturas fotográficas en ciclos de 30 minutos a cada condición. Las imágenes y vídeos fueron adquiridos con el software AxioVision y posteriormente analizadas con el software ImageJ.

Análisis de la Expresión Génica

Extracción de ARN

El perfil de expresión génica se realizó a través de la técnica de retro transcripción de la reacción en cadena de la polimerasa (qRT-PCR) es una herramienta importante en el diagnóstico molecular¹⁰⁸. Las muestras de cultivos primarios, líneas celulares así como las muestras anatómicas de las arterias femorales fueron homogeneizadas en TRIzol (Invitrogen) y el ARN obtenido se resuspendió en agua libre de ARNasas (Ambion). La integridad del ARN se analizó con el uso de ARN Nano Chip (Agilent Technologies).

RT-PCR cuantitativa en tiempo real

La transcripción inversa de ARNm se realizó en un termociclador MyQ (BioRad) utilizando el kit *First Strand cDNA Synthesis Kit* (Roche). El primer paso consistió en

desnaturalizar el ARN para facilitar el anillamiento de los hexámeros y fue llevado a un volumen final de 13 µl conteniendo 1 µg de ARN total y 60 µM de cebadores hexámeros. Las muestras fueron incubadas durante 10 minutos a 65°C y posteriormente mantenidas a 4°C. A continuación se realizó el segundo paso que es la elongación de las nuevas cadenas de ADN. Para ello, se añadió a cada tubo 1X de tampón de retrotranscripción, 20 U de inhibidor de ARNasas, 1mM de dNTPs y 10 U de la transcriptasa inversa TRT. La mezcla se incubó durante 10 minutos a 25°C, 60 minutos a 50°C y finalmente 5 minutos a 85°C. Como controles negativos se incluyeron muestras en las que se omitió la enzima transcriptasa. El ADNc sintetizado fue diluido 10 veces en agua pura libre de nucleasas.

La PCR cuantitativa, utilizando cebadores de los ARNm se realizó en un volumen final de 20 µl, conteniendo 8 µl de ADNc, 0,5 µM de cebadores y 10 µl de *FastStart Universal SYBR Green Master* (Roche). El programa de la PCR de los ARNm consistió en: 3 minutos a 95°C seguido de 40 ciclos de 30 segundos a 95°C y 30 segundos a 60°C. La PCR en tiempo real se llevó a cabo en un termociclador de PCR cuantitativa modelo MyQ (BioRad).

Cebadores

Gen	Secuencia <i>Forward</i>	Secuencia <i>Reverse</i>
PCSK9	GGACTCCTCTGTCTTTGCCC	TCCCGGTGGTCACTCTGTAT
PCSK9.2	CCTGGAGCGGATTACCCCT	CTGTATGCTGGTGTCTAGGAGA
LDL-R	TCTGCAACATGGCTAGAGACT	TCCAAGCATTCGTTGGTCCC
CD36	CTTTGGCTTAATGAGACTGGGAC	GCAACAAACATCACCACACCA
ABCA1	ACCCACCCTATGAACAACATGA	GAGTCGGGTAACGGAAACAGG
NOX2	ACCGGGTTTATGATATTCCACCT	GATTTCGACAGACTGGCAAGA
TNF-α	CCCAGGCAGTCAGATCATCTTC	AGCTGCCCCTCAGCTTGA
CD47	GTACAGCGATTGGATTAACCTCC	ACCACAGCGAGGATATAGGCT
CXCL1	CTGGCTTAGAACAAAGGGGCT	TAAAGGTAGCCCTTGTTTCCCC
NF-κB	AACAGAGAGGATTTGTTTCCG	TTTGACCTGAGGGTAAGACTTCT
36B4	GAGAAACTGCTGCCTCATATC	GCAACATGTCCCTGATCTC

Análisis de la Expresión Proteica

Obtención de extractos totales

Las células fueron resuspendidas en un tampón de lisis (CHAPS 0,5% Tris HCl 10mM, pH 7,5, MgCl₂ 1mM, EGTA 1mM, glicerol 10%) al que se añadieron una combinación de inhibidores de proteasas y fosfatasas (Sigma Aldrich). Las muestras se mantuvieron 15 minutos en hielo y posterior a ello se agitaron vigorosamente durante 30 minutos a 4°C. A continuación se centrifugaron a 12,000 rpm durante 15 minutos y los sobrenadantes se recogieron como extractos totales y fueron almacenados a -80°C. Para la correcta extracción proteica, las muestras fueron mantenidas a 4°C durante todo el proceso.

Determinación de proteínas

La determinación de la concentración proteica de los diferentes extractos se cuantificó en un lector de placas ATOM 340 ATC (SLT LabInstruments). Las medidas se realizaron según el método descrito por Bradford¹⁰⁹, usando albúmina de suero bovino como patrón. Este método se basa en la reacción entre los grupos sulfonados ácidos presentes en el azul de Coomassie, con grupos amino libres presentes en los aminoácidos básicos de las proteínas. Los cambios de absorbancia a 595nm son directamente proporcionales a la concentración de proteína presente.

Electroforesis de proteínas

Las proteínas fueron separadas por electroforesis en condiciones desnaturalizantes. Se utilizaron geles de SDS-poliacrilamida (acrilamida:bisacrilamida, 29:1) a porcentajes de 10 y 8% de acuerdo al peso molecular de las proteínas a analizar. Los extractos de proteína se calentaron durante 8 minutos a 95°C con el tampón de carga Laemmli (Tris-HCL 60mM pH 6,8, SDS 2%, glicerol 10%, β-mercaptoetanol 3% y azul de bromofenol 0,005%). Se cargaron los geles con cantidades iguales de proteína (20-30 µg) por muestra y se sometieron a corriente eléctrica en cubetas de electroforesis de BioRad a temperatura ambiente.

Inmunodetección de proteínas Western-blot

Finalizada la electroforesis, el gel se colocó en una solución de transferencia preparado con Tris 25mM, glicina 192mM y metanol 20% a pH 8,3 en contacto con la membrana de PVDF en dispositivo Transblot Turbo de BioRad a programa estándar por 30

minutos. Finalizada la transferencia, las membranas se someten a bloqueo de sitios inespecíficos con la incubación por 1 hora a temperatura ambiente en una solución de BSA al 3% en PBS. Transcurrido este tiempo, se incubaron los anticuerpos primarios específicos, durante toda la noche a 4°C. A continuación las membranas se lavaron con T-PBS (PBS y Tween-20 0,1%) y fueron expuestas a los correspondientes anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa por una hora. Finalmente y tras realizar los lavados correspondientes, el revelado se llevó a cabo empleando reactivos ECL (Amersham) en un analizador de imágenes acoplado a una cámara (Gel-Doc, BioRad). La cuantificación de la intensidad de las bandas se realizó por densitometría utilizando el programa informático ImageJ.

Reactivos

La PCSK9 recombinante utilizada en los estímulos fue adquirida de MBL International, fabricada por la compañía japonesa Circulex (PCSK9 Wild Type (Human His-tagged recombinant protein) MBL Circulex #CY-R2330). El ácido zaragózico o escualestatina se adquirió de la compañía Santa Cruz Biotechnology (Zaragozic Acid Trisodium Salt #sc-302001)¹¹⁰. Los anticuerpos utilizados para western blot fueron: Anti-PCSK9 rabbit monoclonal antibody (Abcam #ab181142), Anti-LDL Receptor rabbit monoclonal antibody (Abcam #ab52818), Anti-GAPDH mouse monoclonal antibody (Ambion #AM4300), Anti-HO1 rabbit polyclonal antibody (Stressgen #ADI-SPA-895), Anti-COX2 rabbit polyclonal antibody (Cayman #160107). Los medios de cultivo se adquirieron a Gibco, el suero fetal bovino a Sigma-Aldrich y el material fungible fue proveído por Falcon® y Corning®.

Análisis Estadístico

Los datos se representan como la media +/- la desviación estándar. Las diferencias estadísticamente significativas se evaluaron a través de la prueba *t* de Student para comparaciones entre dos grupos. El análisis entre más de dos grupos se realizó mediante la prueba ANOVA de una vía seguida por la prueba de Bonferroni. El software utilizado para el análisis estadístico fue el GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc.). El valor de $p < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo.

Resultados

Resultados

Expresión de PCSK9 en macrófagos y tejidos vasculares

Para abordar nuestro primer objetivo, procedimos al análisis de la expresión de PCSK9 en macrófagos humanos. A través de PCR cuantitativa y Western Blot realizados en macrófagos tanto de la línea celular humana THP-1 como en macrófagos primarios obtenidos de sangre periférica de donadores voluntarios de sangre, observamos la ausencia tanto a nivel genómico como proteico de PCSK9 en sus distintas poblaciones: macrófagos en estado basal, así como en estados polarizados inflamatorio M1 y anti-inflamatorio M2. También, por medio de inmunofluorescencia comparamos la expresión de PCSK9 y LDL-R en macrófagos y hepatocitos, confirmando la presencia del LDL-R en ambos tipos celulares y la ausencia de PCSK9 en macrófagos. Así mismo, transfectamos células de hepatocitos de la línea celular humana HepG2 para generar una línea *PCSK9* KO con plásmidos CRISPR/Cas9 y así confirmar la calidad del anticuerpo empleado en las pruebas realizadas.

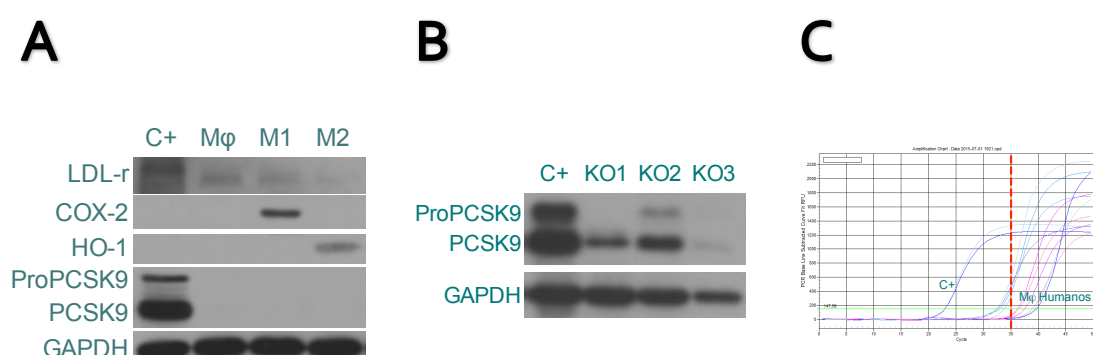


Figura 14. Expresión de PCSK9 en macrófagos humanos. (A) Western blot de macrófagos humanos sin estimular, M1 y M2. C+: HepG2. (B) Western blot de tres clones distintos de hepatocitos transfectados PCSK9 KO. C+: HepG2 sin transfectar. (C) qPCR representativa, las muestras de macrófagos en todas las condiciones obtenían Ct >35, considerado negativo para expresión.

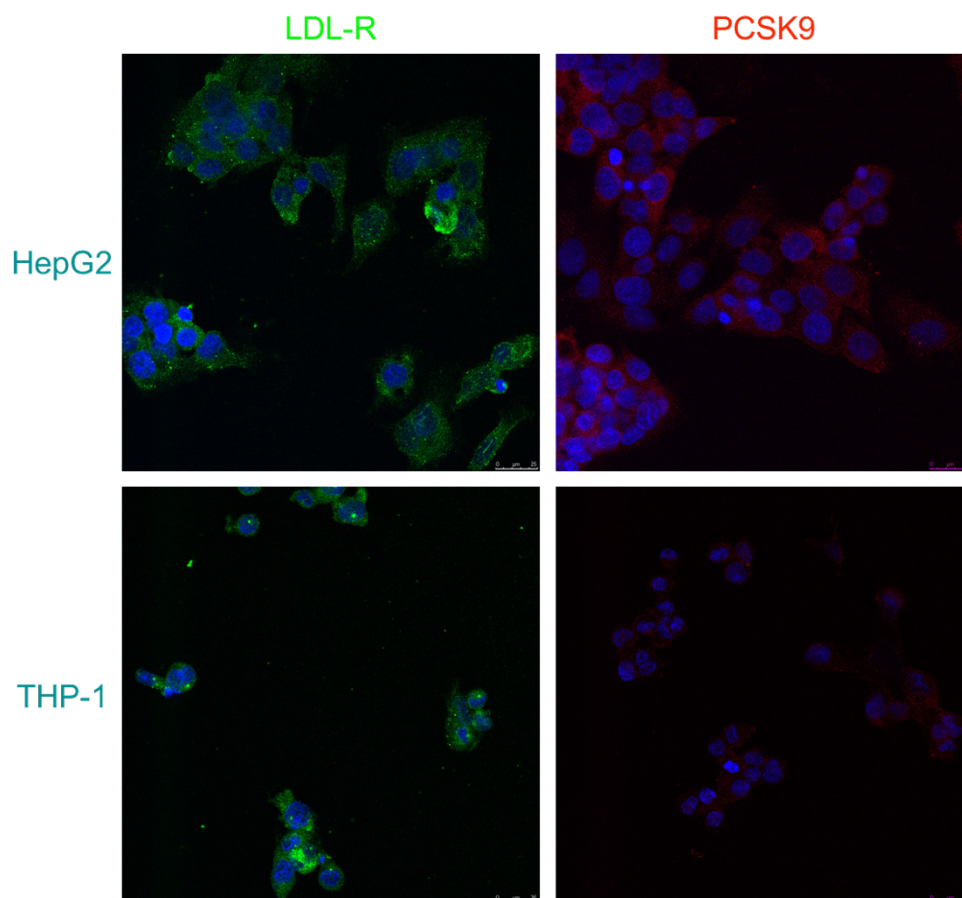
D

Figura 14. (D) Inmunofluorescencia de LDL-R y PCSK9 en hepatocitos y macrófagos.

Decidimos, posteriormente, evaluar la expresión de PCSK9 en tejidos vasculares. Para ello, células musculares lisas aisladas de aortas abdominales humanas de donadores de órganos así como la línea celular humana de células endoteliales H-MEC fueron utilizadas para el análisis. Ding y colaboradores¹¹¹ describen que el estímulo con LPS induce la expresión de PCSK9 en endotelio y células musculares. Por lo tanto, decidimos replicar esta observación. Al igual que en los macrófagos a nivel génico y, por consiguiente, a nivel proteico, la expresión en músculo liso vascular y en células

endoteliales fue nula. Finalmente, concluimos que tejidos vasculares y macrófagos no expresan PCSK9.

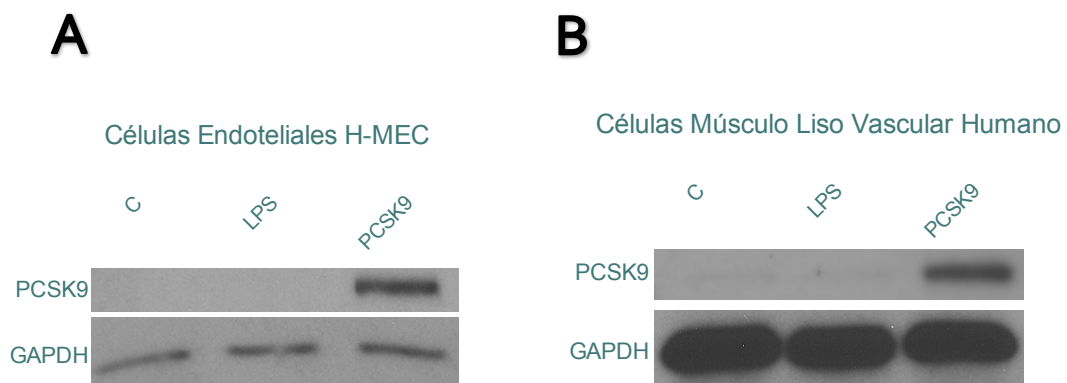


Figura 15. Expresión de PCSK9 en tejidos vasculares. (A) Células endoteliales H-MEC control y estimuladas con LPS. PCSK9 recombinante. (B) Células primarias de músculo liso vascular control y estimuladas con LPS. PCSK9 recombinante.

PCSK9 es secretada por el hígado e induce la disminución del receptor de colesterol LDL en macrófagos

Siendo el hígado el principal órgano productor de PCSK9 y ésta secretada hacia el torrente sanguíneo, nuestro siguiente objetivo fue analizar si la producción de PCSK9 proveniente de hepatocitos ejerce una influencia en el macrófago. Para ello, empleamos la línea celular humana de hepatocitos HepG2 y obtuvimos medios condicionados WT y PCSK9 KO que incubamos con los macrófagos. De la misma manera incubamos con PCSK9 humana recombinante la cual fue posteriormente nuestro estímulo empleado en los experimentos descritos a continuación. Por medio de inmunofluorescencia observamos que PCSK9 es capturada por estas células y se distribuye tanto en citoplasma como en membrana plasmática.

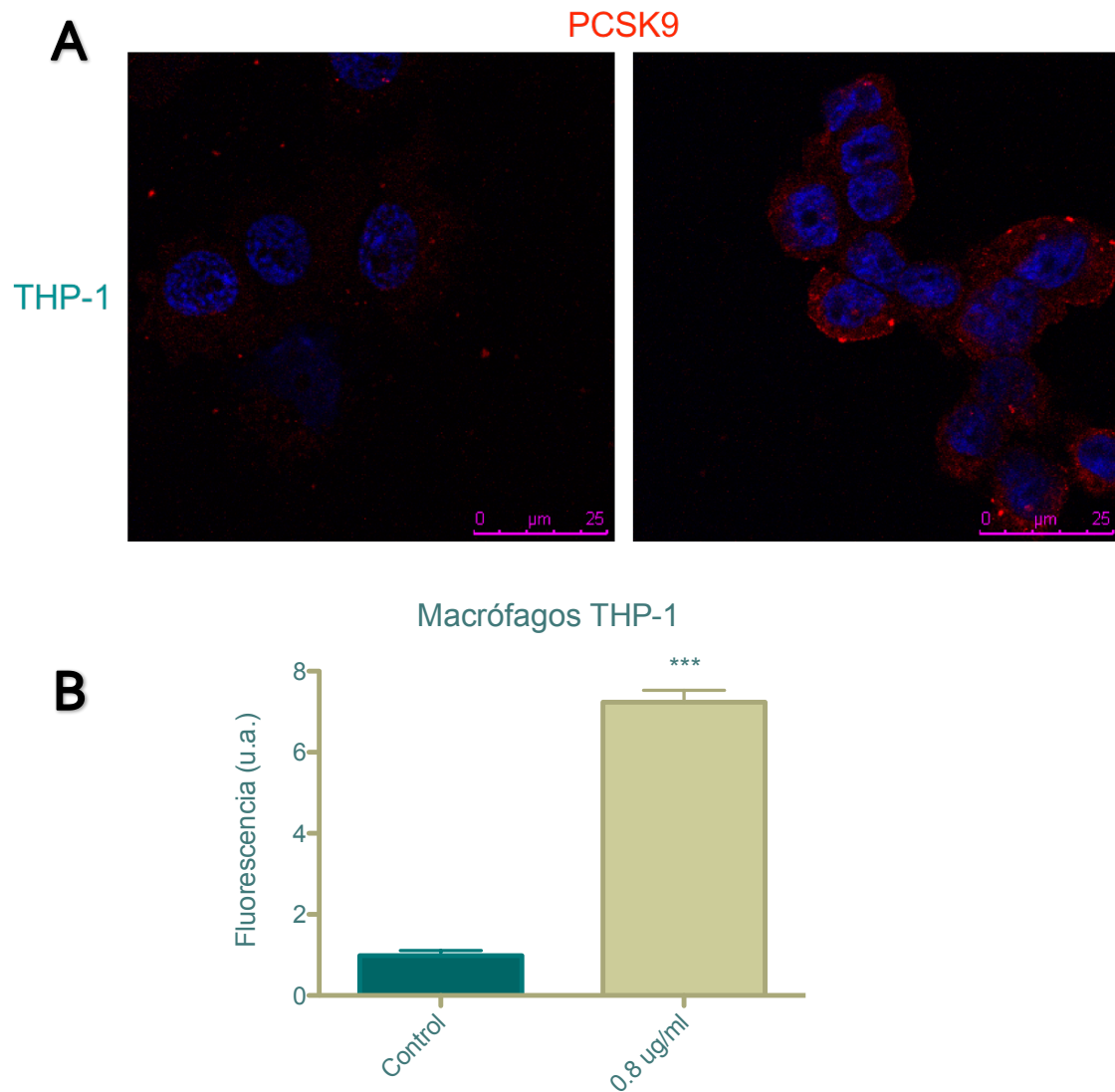


Figura 16. Los macrófagos internalizan PCSK9. (A) Inmunofluorescencia de macrófagos THP-1 estimulados con 0.8ug/ml de PCSK9 recombinante. En rojo PCSK9, en azul, DAPI. (B) Cuantificación de inmunofluorescencia. *** $p < 0,001$.

Nuestra siguiente aproximación fue evaluar la capacidad de incorporación de PCSK9 en el tiempo y dosis. La entrada de PCSK9 en los macrófagos es tan rápida como en 5 minutos y la permanencia de ésta en la célula sobrepasa las 24 horas, sin que sea degradada en el corto plazo. A partir de este momento empleamos 1 hora de incubación en los siguientes experimentos. La captación de PCSK9 en el macrófago es dosis dependiente y, aunque su degradación no se ve afectada en el tiempo, sí induce

una disminución del receptor de colesterol LDL-R. Estas mismas observaciones las llevamos a cabo en macrófagos primarios de sangre periférica.

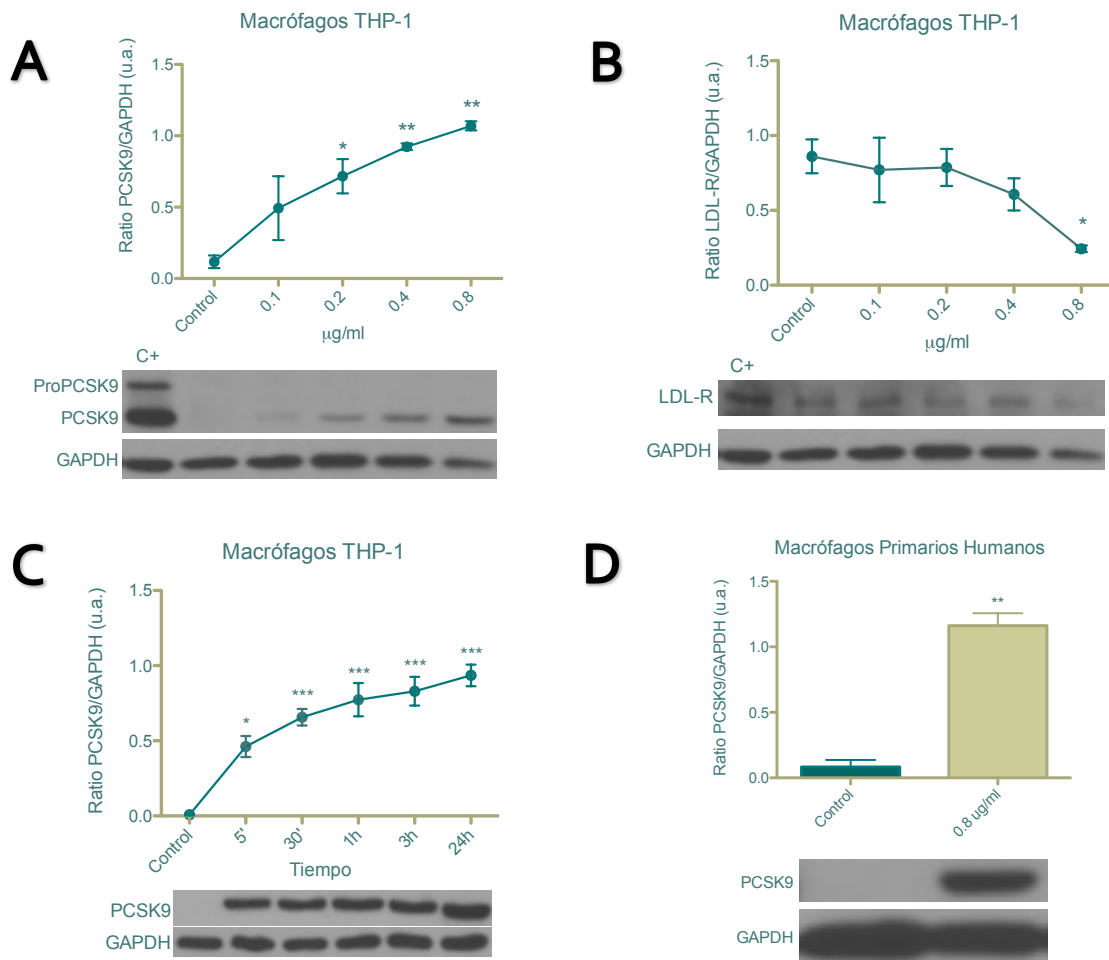


Figura 17. PCSK9 es captada por los macrófagos y disminuye el LDL-R (A) La captación de PCSK9 en macrófagos THP-1 es dosis dependiente. (B) PCSK9 disminuye el LDL-R. (C) PCSK9 se incorpora en el macrófago a tiempos cortos. (D) Los macrófagos humanos capturan PCSK9.

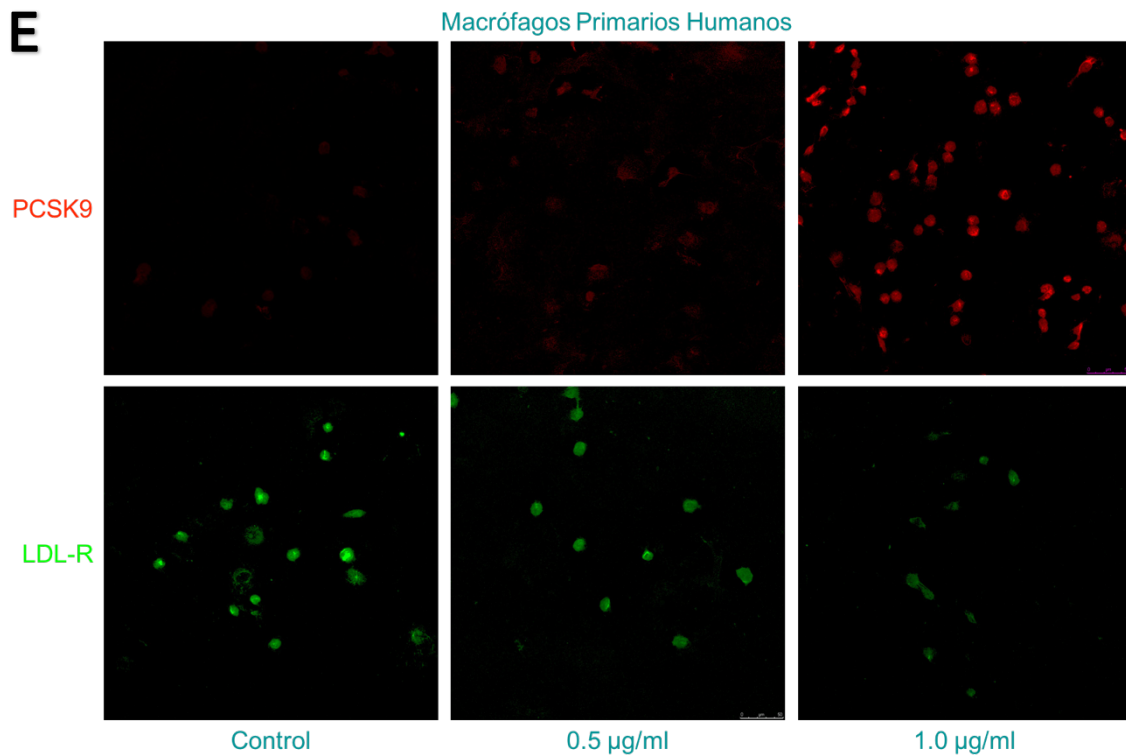


Figura 17. (E) Inmunofluorescencia representativa de LDL-R y PCSK9 en macrófagos primarios humanos.

La entrada de PCSK9 no es dependiente de LDL-R

PCSK9 es incorporada al interior de la célula a través del receptor de LDL-R¹¹². Para evaluar si la captación depende de la cantidad de receptor que hay en la membrana plasmática, empleamos el uso de ácido zaragózico o escualestatina, el cual es un inhibidor de la escualeno sintasa¹¹³ y medimos por citometría de flujo la cantidad de receptor en membrana. La cantidad de LDL-R en membrana aumenta conforme lo hace la dosis de escualestatina y PCSK9 disminuye su presencia. También, por Western blot evidenciamos que la entrada de PCSK9 en el macrófago es mayor si hay mayor cantidad de receptor en membrana.

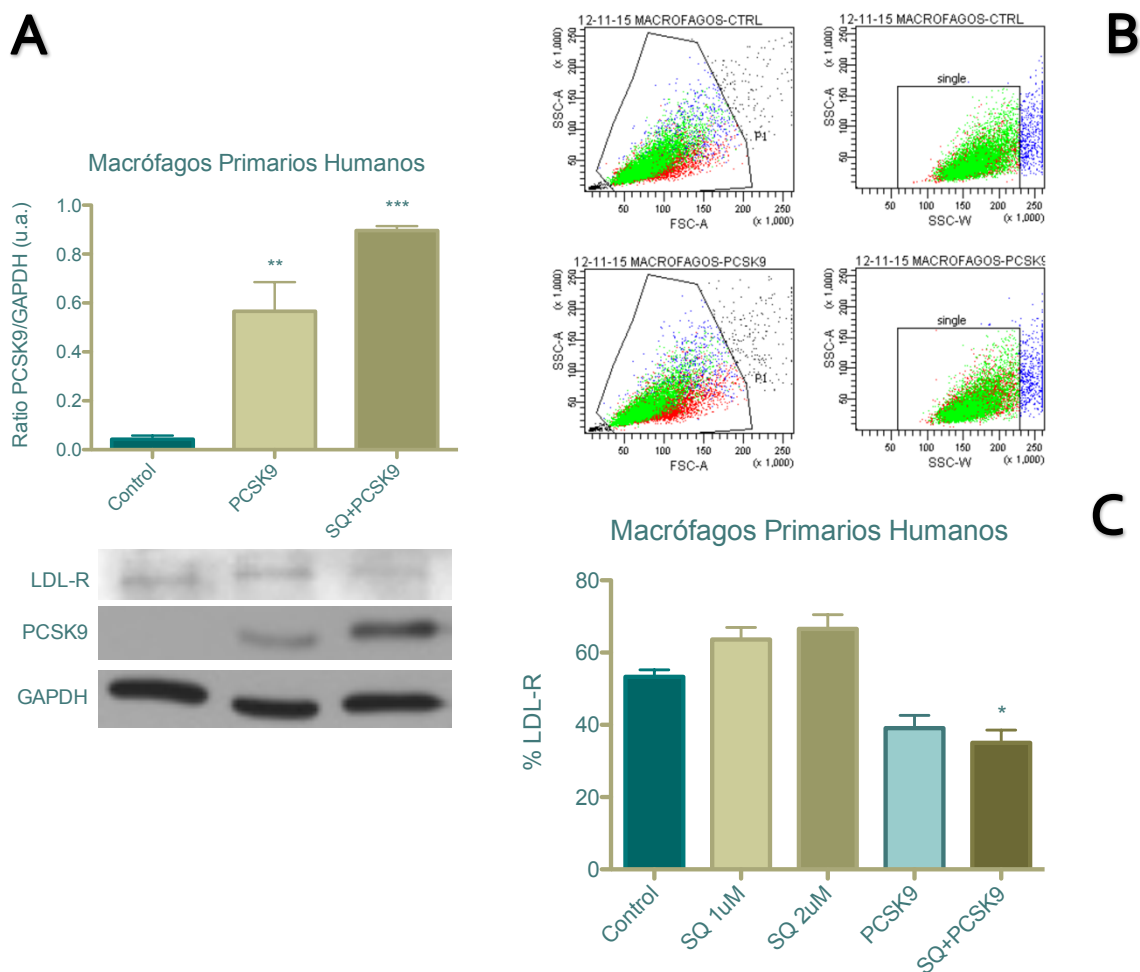
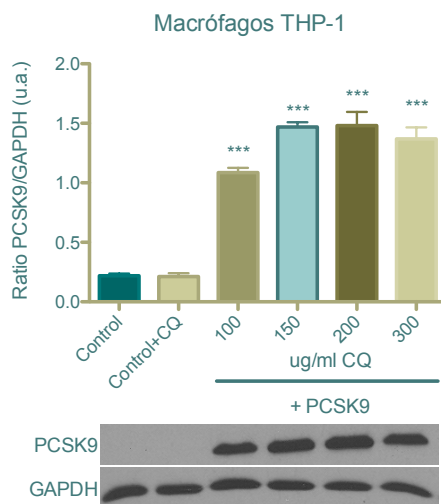


Figura 18. La cantidad de LDL-R modula la entrada de PCSK9 en el macrófago. (A) Western blot de macrófagos humanos controles y estimulados con 0.8 ug/ml de PCSK9 recombinante sola y retratada con 2uM escualestatina (SQ)** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$. (B) Diagrama representativo del ensayo por citometría de flujo en macrófagos humanos. (C) LDL-R en membrana aumenta con escualestatina y disminuye en presencia de PCSK9. * $p < 0.05$.

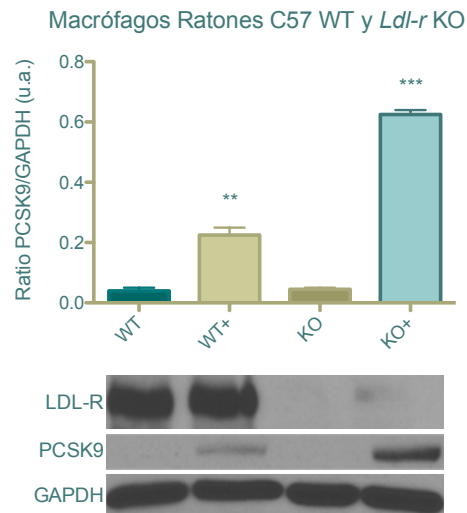
La endocitosis del LDL-R es mediada por vesículas de clatrina¹¹⁴, la cual permite su empaquetamiento en el endosoma al ser internalizado. Quisimos evaluar si la presencia de LDL-R es necesaria para la entrada de PCSK9 en el macrófago, por lo que procedimos a inhibir la endocitosis mediada por clatrina con el uso de cloroquina¹¹⁵ y a

su vez, empleamos macrófagos de ratones *Ldl-r* KO. Utilizando distintas dosis de cloroquina, PCSK9 internalizó en macrófagos humanos sin limitación alguna. De igual modo, en ratones *Ldl-r* KO se observó una mayor entrada de PCSK9 que en ratones WT, por lo que la entrada de PCSK9 no es exclusiva de LDL-R.

A



B



C

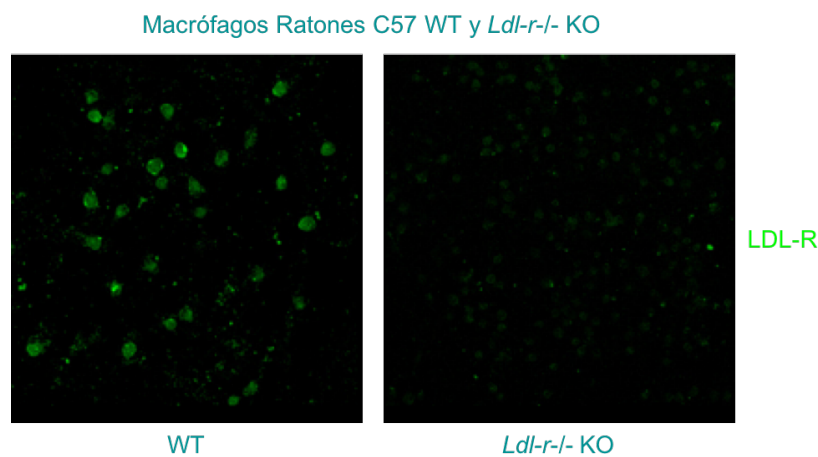


Figura 19. PCSK9 no es dependiente de LDL-R. (A) Western blot de macrófagos humanos pretratados con cloroquina a distintas dosis y estimulados con 0.8ug/ml de PCSK9 recombinante. La inhibición de la endocitosis no impidió la entrada de PCSK9. *** $p < 0.001$. (B) Western blot e inmunofluorescencia (C) de macrófagos de ratones WT y *Ldl-r* KO estimulados con 0.8 ug/ml de PCSK9 recombinante. Los ratones *Ldl-r* KO presentaron mayor entrada de PCSK9 a su interior. ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$.

PCSK9 disminuye CD36 en la superficie de los macrófagos

Dada la implicación que CD36 tiene en la entrada de lípidos, principalmente aquellos oxidados al interior de la célula¹¹⁶, procedimos a silenciar el gen *LDL-R* en macrófagos humanos y evaluamos los niveles de este transportador de membrana por citometría. Tanto en macrófagos *LDL-R* silenciados como en macrófagos controles, el porcentaje de CD36 disminuye al estímulo con PCSK9, lo que sugiere que la entrada puede darse a través de este transportador.

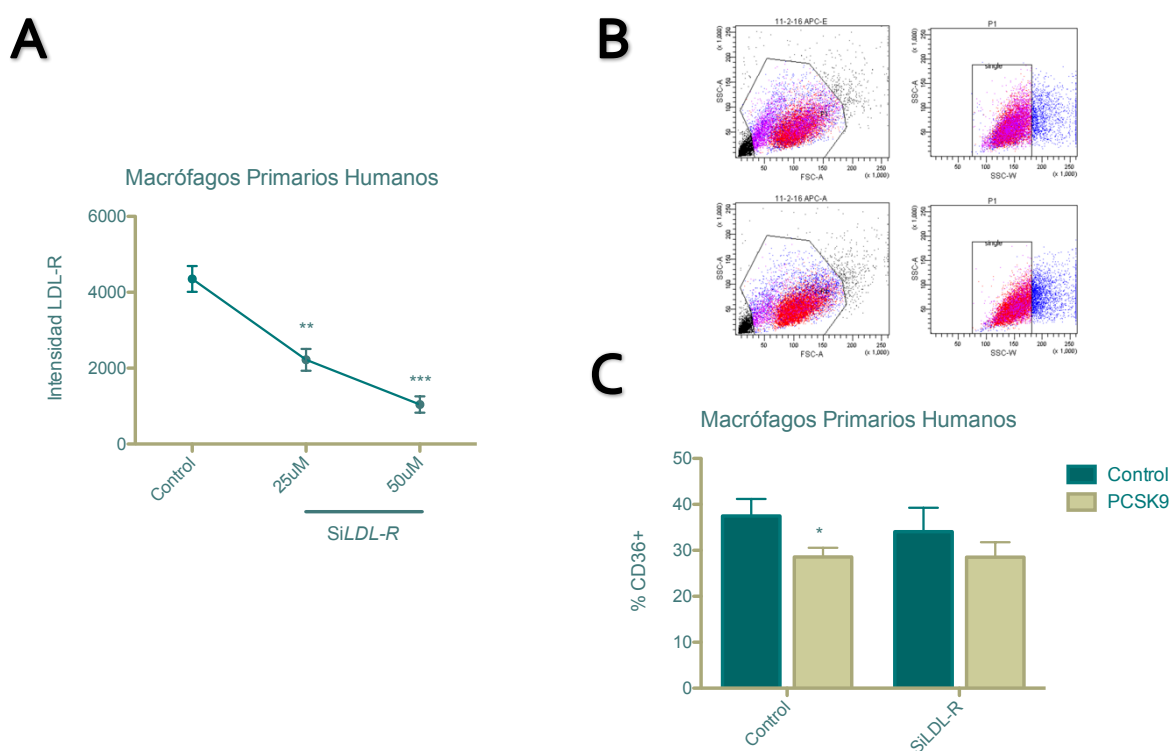


Figura 20. CD36 disminuye en presencia de PCSK9. (A) Silenciamiento de *LDL-R* y cuantificación por citometría en macrófagos humanos. Se empleó la concentración de 50uM para las muestras transfectadas. (B) Diagrama representativo de citometría de flujo. (C) CD36 disminuye en macrófagos controles y silenciados para *LDL-R*. * $p < 0.05$.

PCSK9 aumenta el estrés oxidativo en macrófagos y la sensibilidad a la apoptosis

El estrés oxidativo es uno de los factores que contribuyen al daño celular y que participa en el desarrollo de la patología cardiovascular¹¹⁷. Los radicales libres son generados por diversos estímulos y ejercen múltiples funciones, algunas pueden ser protectoras, otras en detrimento de la homeostasis. Los macrófagos, al ser partícipes en el desarrollo de la placa a través de la generación de mediadores inflamatorios así como de radicales libres, son piezas clave en la evolución de la enfermedad¹¹⁸. Por ello, evaluamos el estado redox de estas células ante la presencia de PCSK9. Polarizamos los macrófagos a las poblaciones M1 y M2 utilizando varios estímulos con citoquinas. M1 con el uso de LPS e IFN γ por un lado, y otra forma de M1 con el uso de MCSF. Para M2, IL-4 e IL-10 en una de ellas y la otra polarizada con GMCSF. Con el uso de las sondas diclorofluoresceína (H₂DCFDA), hidroetidina (HE) y difluorofluoresceína (DAF-2), analizamos la producción de radicales peróxido de hidrógeno, peroxinitrito, óxido nítrico y superóxido. A la incubación de PCSK9 por 24 horas, todas las poblaciones de macrófagos aumentaron la producción de radicales peróxido de hidrógeno y peroxinitrito en un 50% aproximadamente. La producción de radicales superóxido y óxido nítrico se observó principalmente en las poblaciones controles y M1.

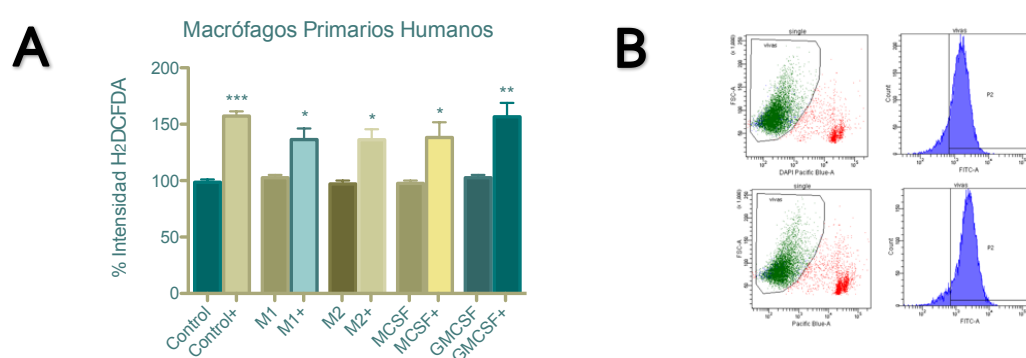
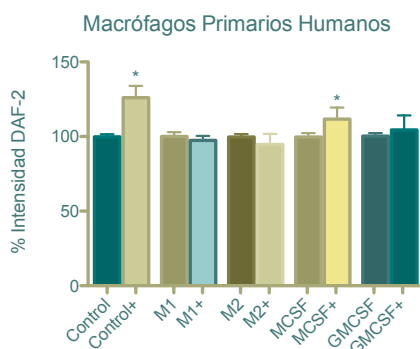


Figura 21. PCSK9 induce un mayor estrés oxidativo en macrófagos humanos, tanto en macrófagos no estimulados como en subpoblaciones M1 y M2. (A) H₂DCFDA mide la producción de radicales peróxido de hidrógeno y peroxinitrito y éstos aumentan en todas las poblaciones de macrófagos en presencia de PCSK9. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$. (B) Diagrama representativo de muestra control y estimulada con PCSK9 midiendo la sonda H₂DCFDA.

C



D

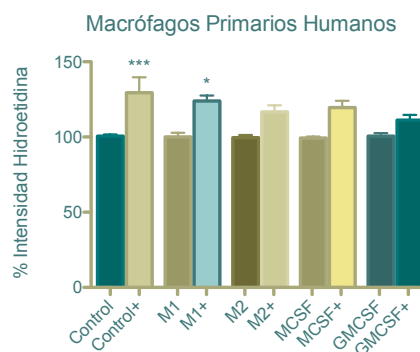


Figura 21. (C) DAF-2 mide la producción del radical óxido nítrico, aumentado en macrófagos sin polarizar y M1 polarizado con MCSF. $*p<0.05$. (D) Hidroetidina mide la producción del radical superóxido, el cual aumenta por igual en todas las poblaciones de macrófagos, principalmente en aquellos sin polarizar y M1 estimulados con PCSK9. $*p<0.05$ $***p<0.001$.

Dado el aumento en la producción de estos radicales, este entorno puede vulnerar la viabilidad celular. Para ello, continuamos con el estudio del potencial de membrana mitocondrial de todas las poblaciones de macrófagos con el uso de la sonda CMXRos MitoTracker® por citometría de flujo. Observamos que en todas hubo una disminución del potencial, lo que sugiere una mayor predisposición a la apoptosis. El siguiente paso consistió en someter a los macrófagos a estímulos apoptóticos para confirmar esta observación. Anexina V es un marcador de apoptosis que se une a moléculas de fosfatidilserina¹¹⁹, presente en la superficie celular una vez iniciado el proceso apoptótico¹²⁰. Incubamos grupos controles y silenciados para *LDL-R* con PCSK9 por 24 horas y posteriormente inducimos apoptosis con estaurosporina, un paninhibidor de proteínas quinasas. Los hallazgos fueron que en presencia de PCSK9, la población de células positivas para anexina V fue discretamente menor que los controles. Sin embargo, aunque no significativo, hay un ligero aumento en el número de células muertas DAPI positivas, lo que sugiere una muerte por necrosis¹²¹.

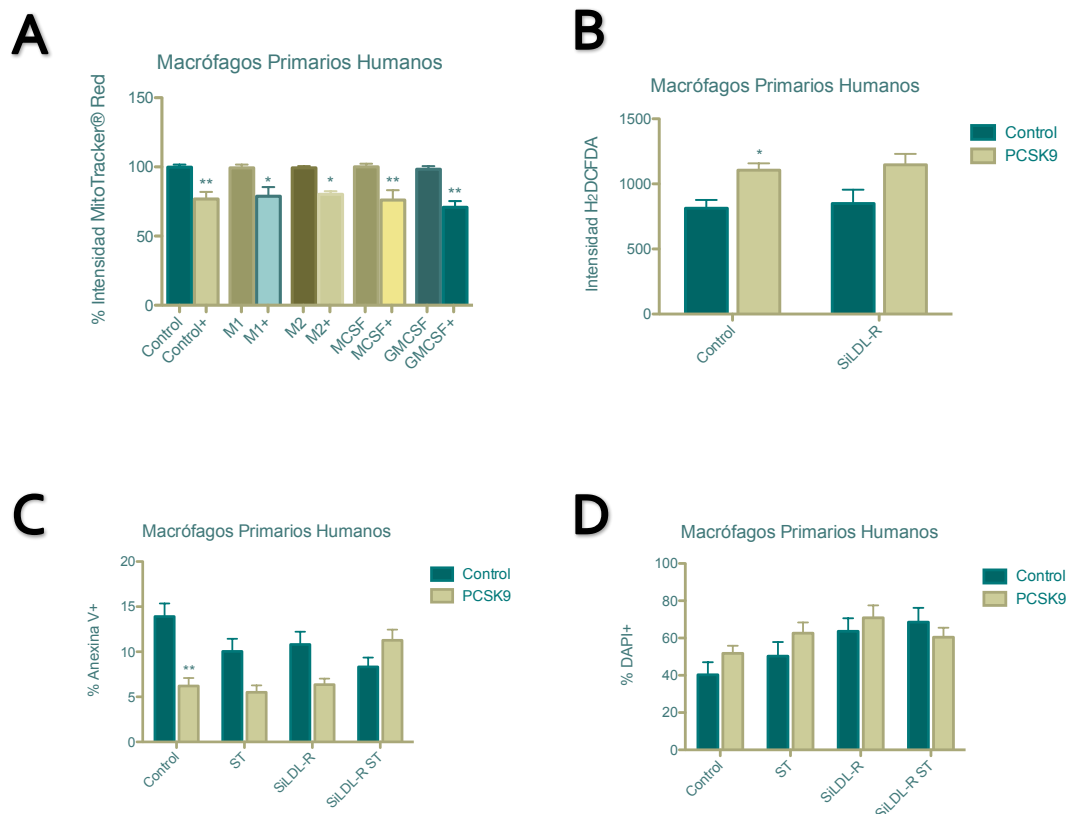


Figura 22. El potencial de membrana mitocondrial disminuye ante PCSK9. (A) Porcentaje de la intensidad de señal producida por CMXRos Mitotracker en macrófagos en sus distintas subpoblaciones. ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$. (B) Control positivo de aumento en producción de ROS en macrófagos controles y silenciados para LDL-R. (C) Apoptosis en macrófagos ante PCSK9. Porcentaje de células anexina V+ (C) y DAPI (D) positivas en poblaciones control y silenciadas para LDL-R y estimuladas con estaurosporina. ** $p < 0,01$.

NOX2 media la producción de especies reactivas de oxígeno inducidas por PCSK9

La producción de especies reactivas de oxígeno es una actividad fundamental de las células inmunes y su generación proviene principalmente del grupo de enzimas NADPH oxidasas. Dentro de este grupo destaca NOX2 que es específica de macrófagos, por lo que procedimos a evaluar los niveles de expresión de esta enzima y marcadores de inflamación en el macrófago. Al estimular con PCSK9 en distintas dosis observamos que a mayor concentración, mayor la expresión de NOX2, NF κ B, CXCL1 y CD47. No se

apreciaron cambios significativos en la expresión de $\text{TNF}\alpha$ y la expresión de CD36 y LDL-R fue discretamente regulada a la baja.

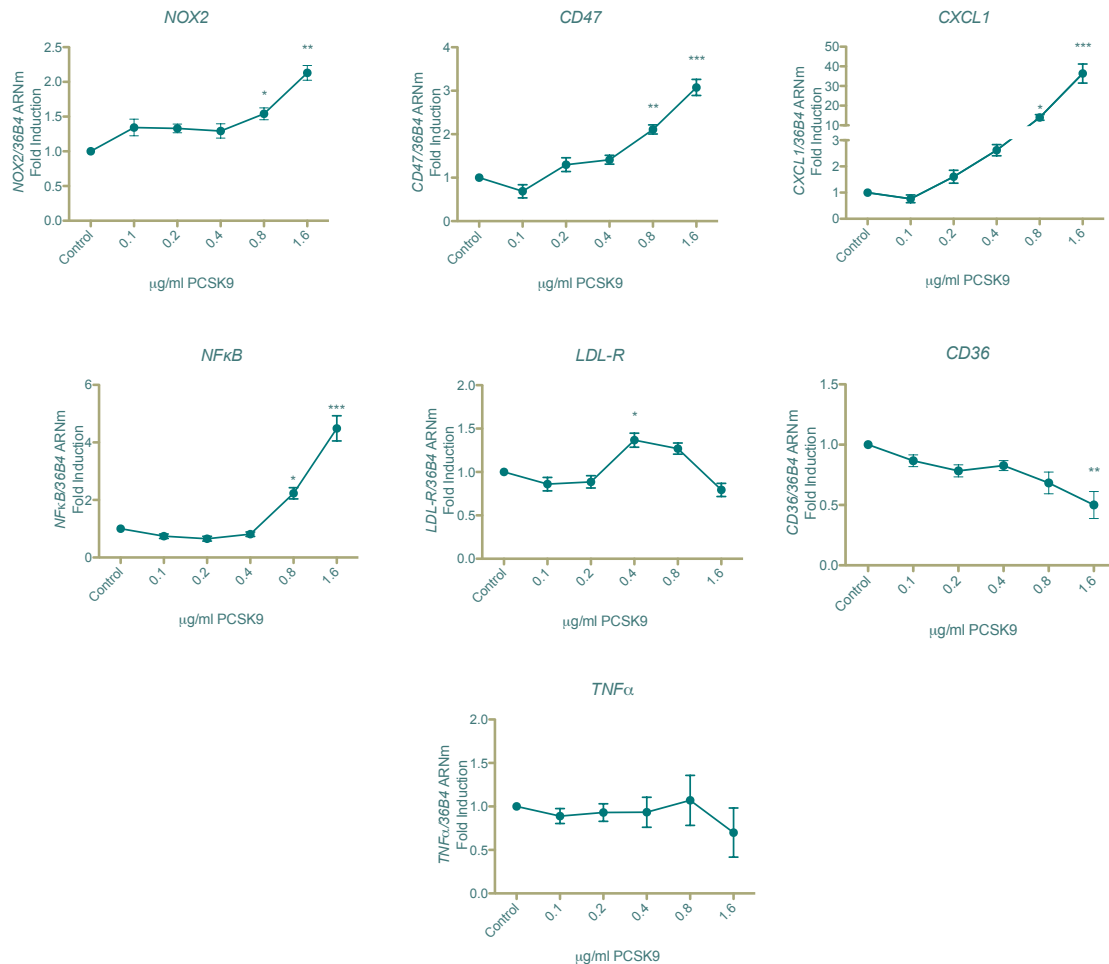


Figura 23. PCSK9 modula la expresión de NOX2 y genes relacionados. NOX2, CD47, CXCL1 y NFκB se modulan de forma dosis/dependiente. LDL-R y CD36 discretamente a la baja. $\text{TNF}\alpha$ sin cambios significativos. * $p<0.05$ ** $p<0.01$ *** $p<0.001$.

En base a estos hallazgos, evaluamos si la producción de radicales libres puede mediarse a través de la regulación de NOX2. Utilizamos VAS2870, un paninhibidor de NOX¹²², dado que actualmente no hay inhibidores totalmente específicos de NOX2. Con un pre-tratamiento de VAS2870 de 30 minutos previa al estímulo de PCSK9, evaluamos el estado redox de los macrófagos así como la expresión de NOX2.

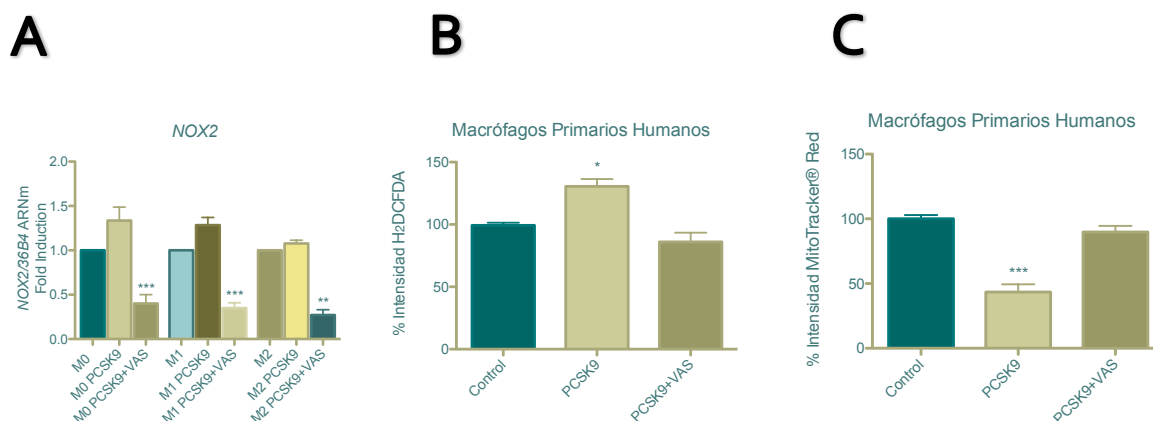


Figura 24. La inhibición de NOX2 impide un aumento de ROS así como la disminución del potencial de membrana mitocondrial inducido por PCSK9. (A) VAS2870 regula a la baja la expresión de NOX2 en macrófagos tratados con PCSK9. $**p<0.01$ $***p<0.001$ respecto a las muestras tratadas con PCSK9. (B) VAS2870 inhibe el aumento de radicales hidroxilo, peróxido de hidrógeno y peroxinitrito inducido por PCSK9. $*p<0.05$ (C) VAS2870 mantiene el potencial de membrana mitocondrial ante PCSK9. $***p<0.001$.

PCSK9 y su efecto sobre la fagocitosis y migración

Evaluamos la influencia de PCSK9 sobre la capacidad de migración y fagocitosis de los macrófagos. Con ensayos de herida documentada por microscopía con el uso del Cell Observer analizamos la migración y con partículas fluorescentes de zymosan A, provenientes de *S. cerevisiae*, analizamos la fagocitosis por citometría de flujo. En el caso de la migración, en presencia de PCSK9 las heridas cierran un 10% más que los grupos control, sin que esta diferencia sea significativa. En la fagocitosis, los macrófagos no mostraron ningún cambio a distintas dosis de PCSK9.

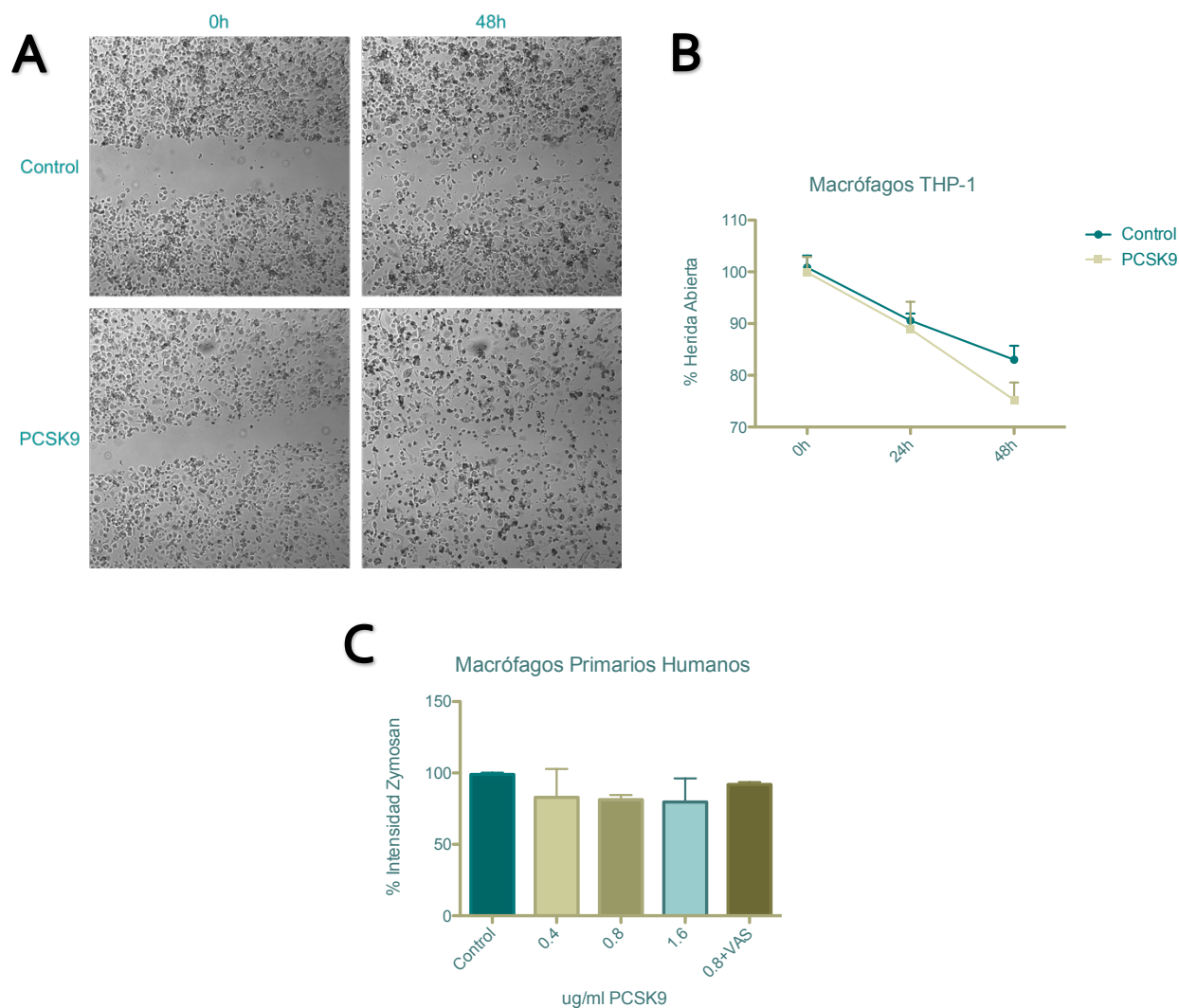
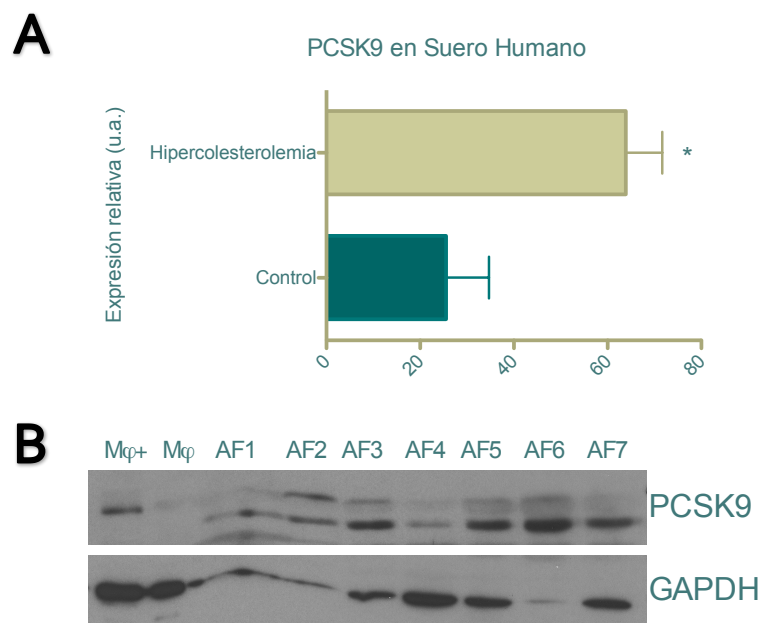


Figura 25. La migración no se ve aumentada en presencia de PCSK9. (A) Imágenes de macrófagos controles y estimulados con PCSK9 en tiempos 0 y 48 horas. (B) Porcentaje de herida abierta en macrófagos en presencia de PCSK9. Aunque disminuye un 10% la herida en presencia de PCSK9, la diferencia no es significativa.

PCSK9 se encuentra en lesiones ateroscleróticas avanzadas y en niveles mayores en suero de pacientes hipercolesterolémicos

Para aproximar nuestras observaciones hacia el contexto de la patología cardiovascular, analizamos muestras de sueros de pacientes diagnosticados con

hipercolesterolemia y comparamos las mismas con muestras controles. Los niveles de PCSK9 en suero de pacientes con hipercolesterolemia se mantienen por arriba respecto a los pacientes control. De igual modo, recolectamos muestras anatómicas de arterias femorales de pacientes sometidos a amputación de miembro inferior y realizamos estudios de proteína y expresión génica para evaluar la presencia de PCSK9 en la vasculatura de pacientes con enfermedad arterial periférica. Como pudimos observar, todas las arterias femorales humanas muestran distintos grados de expresión de PCSK9, lo que sugiere un acúmulo exógeno en las lesiones ateroscleróticas.



*Figura 26. PCSK9 se encuentra en lesiones ateroscleróticas avanzadas y en mayor cantidad en suero de pacientes hipercolesterolémicos. (A) Niveles de PCSK9 en suero de pacientes con hipercolesterolemia y pacientes controles. (B) WB de arterias femorales en pacientes sometidos a amputación por enfermedad arterial periférica. * $p < 0.05$*

Discusión

Discusión

La aterosclerosis es una patología compleja en la que inciden múltiples factores tanto celulares como bioquímicos. Así, desde los niveles altos de colesterol en sangre, que son por mucho el factor más importante y predisponente para su desarrollo, hasta factores ambientales o alteraciones genéticas que afectan los sistemas reguladores de la homeostasis vascular inciden en su evolución. Los macrófagos como célula clave en la acumulación de lípidos y desarrollo de la placa a través de la generación de moléculas de inflamación, las células endoteliales en la activación y reclutamiento de estas células y el músculo liso vascular que prolifera y retiene el sitio de lesión.

Nuestros resultados aportan un mayor conocimiento sobre el efecto que PCSK9 ejerce en el desarrollo de aterosclerosis más allá de la regulación del LDL-R y sus efectos en los niveles plasmáticos de LDL. Hemos evidenciado que esta proteasa no se expresa en el músculo liso vascular, las células endoteliales y en los macrófagos, contrario a observaciones previas^{61,111}. Sin embargo, la circulación constante de PCSK9 en plasma proveniente del hígado hace que ésta se incorpore en las células, ya sea a través de la ya conocida endocitosis mediada por el LDL-R o también de manera independiente de él, como evidenciamos con el uso de macrófagos *Ldl-r* KO. De hecho, no sólo la endocitosis mediada por receptor o la pinocitosis, si no también deben existir otras vías aún desconocidas de entrada a la célula para PCSK9 como puede ser el transportador CD36 o incluso la endocitosis mediada por caveolina, a estudiar más adelante. En este contexto, pocos trabajos han investigado mecanismos alternos de entrada de PCSK9. Demers *et al.* observó la regulación de CD36 por PCSK9 en células HEK293 y HepG2¹²³, como hemos presentado nosotros en macrófagos. Existen estudios que proponen que la entrada de colesterol puede ser independiente de estos receptores²⁸, lo que también proponemos para PCSK9, tanto la proteína sola como unida a complejos con las LDL. Agregados de lipoproteínas pueden ser capturados por la célula a través de fagocitosis e incluso la pinocitosis puede incorporar partículas nativas de LDL²⁹. PCSK9 puede ir unida a las LDL y entrar por esta vía o incluso ser endocitada de forma independiente. Una vez capturadas, las partículas de colesterol son hidrolizadas en los endosomas a colesterol libre y ácidos grasos. Por otro lado, PCSK9 no se degrada en cuanto ingresa

en la célula, incluso ésta puede permanecer en el macrófago por más de 24 horas sin presentar cambios en su concentración intracelular.

Estudios histológicos de placas humanas muestran en las lesiones poblaciones de macrófagos M1 y M2. Los macrófagos M1 inflamatorios secretan citoquinas inflamatorias como IL-6 y IL-12, además de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno. Los macrófagos M2 antiinflamatorios expresan arginasa-1 así como TGFβ y, usualmente se encuentran distantes a los sitios donde los M1^{124,125}. Sin embargo, los fenotipos de macrófagos en las lesiones parecen ser más complejos debido a que se encuentran en un microambiente de señales diversas e incluso opuestas. En este contexto, presentamos por primera vez que la endocitosis de PCSKg en los macrófagos induce una mayor producción de especies reactivas de oxígeno tanto en una población como en otra, lo que es importante desde el punto de vista de progresión de la placa. Se ha observado que los macrófagos M2 suelen estar presentes en los estadios iniciales de la lesión, durante la formación de la estría grasa y, conforme progresa, la población pasa a ser más densamente poblada por macrófagos M1¹²⁶.

La producción de especies reactivas de oxígeno promueve la disfunción del endotelio, la oxidación de las LDL así como la disminución en la biodisponibilidad del NO[•], lo que conlleva a la vasoconstricción vascular, agregación plaquetaria y a la adhesión de más leucocitos al endotelio^{127,128}. El H₂O₂ promueve la aterogénesis a través de la producción de factores de transcripción, entre ellos NFκB, que participa en la expresión de moléculas de adhesión como VCAM-1, ICAM-1 entre otras citoquinas. De este modo, la producción de ROS por los macrófagos M1 y M2 por efecto de PCSKg tiene una acción deletérea en los sitios de lesión, característica no conocida de esta proteasa. Se ha descrito que la tensión tangencial o *shear stress* promueve un aumento en la producción de ROS por células endoteliales y músculo liso, acompañado de un aumento en la expresión de PCSKg⁶¹. También el estímulo con LPS induce expresión de PCSKg en estas células. En comparación con esos resultados, nosotros no observamos expresión de PCSKg ni en condiciones basales ni bajo el efecto de LPS en endotelio ni músculo liso ni en macrófagos. Por el contrario, la producción de ROS por los macrófagos es promovida por la presencia de PCSKg exógena.

La activación de este estado por PCSKg predispone al macrófago a una muerte por necrosis cuando se somete a estímulos apoptóticos. La inducción de apoptosis con

estaurosporina mostró que, bajo el estímulo de PCSK9, las células apoptóticas anexina V+ eran menos que en los grupos controles. Sin embargo, el porcentaje de células muertas anexina V+/DAPI+ era mayor en presencia de PCSK9. Un trabajo describe que en células de feocromocitoma de rata, la apoptosis inducida por oxLDL promueve una expresión de *PCSK9* y que su silenciamiento reduce la muerte en estas células¹²⁹. Otro trabajo, precisamente hecho en macrófagos THP-1 estimulados con oxLDL, refiere la expresión de *PCSK9* tanto a nivel genómico como proteico y el silenciamiento de *PCSK9* disminuye la apoptosis de estas células ocasionada por oxLDL¹³⁰. Resultados con los cuales diferimos, ya que la expresión de *PCSK9* en macrófagos THP-1 como en los cultivos primarios humanos es nula a nivel basal como bajo estímulos polarizantes y oxLDL realizados en las primeras aproximaciones de esta tesis.

Varios estudios han investigado el papel de las NOX por individual en modelos murinos de aterosclerosis. Por ejemplo, los niveles de expresión de *Nox2* fueron elevados en aortas de ratones ateroscleróticos *ApoE*^{-/-}, mientras que los de *Nox4* no fueron modificados significativamente entre grupos *ApoE*^{-/-} y WT¹³¹. Sin embargo, estudios que utilizan la delección de *Nox2* en ratones *ApoE*^{-/-} no dan resultados consistentes. En los ratones doble KO *Nox2*^{-/-}/*ApoE*^{-/-}, sometidos a una dieta alta en grasas, se encontró que no hay una protección contra la aterosclerosis cuando se examinaron los senos aórticos de ambos grupos, a pesar de la disminución en la producción de anión superóxido vascular¹³². Resultados similares se han reportado en ratones *p47phox*^{-/-} (subunidad citosólica de NOX) cruzado con *ApoE*^{-/-}¹³³. La sobre-expresión de *Nox2* endotelial en ratones *ApoE*^{-/-} fue suficiente para incrementar la producción de superóxido vascular, aumentar la activación endotelial y el subsecuente reclutamiento de macrófagos, pero este aumento inicial en el reclutamiento de macrófagos no alteró la progresión de aterosclerosis¹³⁴. En contraste con estos estudios, Barry-Lane y colaboradores encontraron que la lesión del área total de la aorta (desde el arco hasta la bifurcación) se encontraba reducida en ratones *p47phox*^{-/-}/*ApoE*^{-/-}, sugiriendo que NOX1 y NOX2 pueden estar involucradas en el desarrollo de aterogénesis¹³⁵. Las discrepancias entre estos resultados pueden deberse a que la delección de *p47phox*^{-/-} promueve una inmunodeficiencia en los ratones, los cuales presentan infecciones y cursan con una inflamación crónica que puede contrarrestar los efectos anti ateroscleróticos de la pérdida de función de NOX.

Enfocándonos en el macrófago, analizamos la expresión de las distintas isoformas de NOX (*NOX1*, *NOX2*, *NOX4*) y sólo *NOX2* se expresa en estas células.

El aumento observado en la expresión de *NOX2* por PCSK9 supone el aporte de anión superóxido producido por esta enzima para luego ser convertido en las distintas especies reactivas de oxígeno y nitrógeno como el peróxido de hidrógeno o los peroxinitritos observados en los ensayos de producción de ROS en los macrófagos. Así mismo, este aumento en la expresión de *NOX2* se acompaña del aumento en *NFκB*, que promueve la producción de VCAM-1 e ICAM-1 por el endotelio¹³⁶, *CXCL1*, que está vinculada a la adhesión y trans migración de los monocitos¹³⁷ y *CD47*, que participa en la migración de leucocitos¹³⁸. Las observaciones que obtuvimos de los ensayos de migración no son estadísticamente significativas pero muestran una tendencia de los macrófagos a migrar más que los grupos controles. La inhibición de *NOX2* con el uso de VAS2870 permitió contrarrestar los efectos observados en la producción de ROS y la disminución del potencial de membrana, lo que sugiere que *NOX2* es necesaria para esta activación inducida por PCSK9.

Mientras que los estudios en modelos animales son conflictivos, la deficiencia hereditaria de la NADPH oxidasa, particularmente *NOX2*, ocurre en los humanos con la enfermedad granulomatosa crónica (EGC). En humanos, la deficiencia genética de *NOX2* está asociada a un incremento de la vasorrelajación dependiente del endotelio y una disminución de marcadores de envejecimiento y estrés oxidativo¹³⁹. De manera importante, la disminución en el tamaño de la lesión aterosclerótica ha sido descrita en estos pacientes, lo que enfatiza un posible rol de *NOX2* en el desarrollo de aterosclerosis¹⁴⁰. Aunque prometedoras, estas observaciones deberían interpretarse cuidadosamente, ya que la enfermedad granulomatosa crónica es una enfermedad seria que conlleva importantes cambios en el sistema inmune, el cual puede afectar la vasculatura en otras distintas formas.

Para obtener una mayor aproximación a nuestras observaciones *in vitro*, comparamos el suero de pacientes diagnosticados con hipercolesterolemia contra pacientes controles que mantienen niveles <200 mg/dl. La expresión relativa de PCSK9 en el suero de pacientes hipercolesterolémicos fue significativamente mayor que en los controles, lo que explica los mayores niveles de LDL en este grupo. Así mismo, la aproximación que realizamos con las arterias femorales de pacientes con enfermedad arterial

periférica nos hace proponer que PCSK9 está presente en la vasculatura, pero que esta expresión proviene del exterior, principalmente del hígado, se deposita en los sitios de lesión y promueve el desarrollo de aterosclerosis a través de la producción de ROS en los macrófagos presentes en la placa. Cabe señalar que los monocitos circulantes en el torrente sanguíneo no capturan esta proteína del plasma, lo que sugiere que esto ocurre sólo al migrar al espacio subendotelial y diferenciarse en macrófagos.

Finalmente, las observaciones de PCSK9 sobre los niveles circulantes de LDL impulsaron el desarrollo de fármacos dirigidos al bloqueo e inhibición de esta proteasa. Al día de hoy, terapias biológicas a base de anticuerpos monoclonales han sido ya aprobados y se encuentran en el mercado bajo los nombres de Repatha® (evolcumab) y Praluent® (alirocumab), cuyos resultados preliminares en los más recientes ensayos clínicos muestran reducciones significativas en los niveles de LDL respecto a los grupos tratados con placebo, así como una disminución en el riesgo de eventos cardiovasculares¹⁴¹. Nuestro siguiente paso será evaluar si el bloqueo de PCSK9 con el uso de anticuerpos monoclonales impedirá que sea endocitada por los macrófagos y que éstos dejen de producir las radicales libres que promueven disfunción y enfermedad. A pesar de los resultados satisfactorios que la terapia biológica muestra en la inhibición de PCSK9, es fundamental profundizar en la fisiología de esta proteína en los distintos órganos y sistemas del cuerpo humano.

Conclusiones

Conclusiones

Las conclusiones de la presente tesis son:

- ◆ PCSK9 no se expresa en macrófagos, endotelio y músculo liso vascular.
- ◆ PCSK9 es secretada mayoritariamente por el hígado y es captada por el macrófago, disminuye los niveles de CD36 y LDL-R y su entrada no depende exclusivamente de este último receptor.
- ◆ PCSK9 aumenta la producción de radicales libres en macrófagos, disminuye el potencial de membrana mitocondrial y sensibiliza estas células a la muerte por necrosis.
- ◆ La producción de radicales libres dependientes de PCSK9 proviene de la activación de la NADPH oxidasa *NOX2* y su inhibición revierte significativamente este efecto.
- ◆ PCSK9 induce una mayor expresión de *CD47* y *CXCL1* en macrófagos y promueve un discreto aumento en la migración de estas células.
- ◆ PCSK9 no ejerce cambios en la fagocitosis de los macrófagos.
- ◆ Los pacientes con hipercolesterolemia presentan niveles elevados de PCSK9 en suero respecto a pacientes controles.
- ◆ PCSK9 se expresa a nivel proteico en arterias ateroscleróticas avanzadas, lo que sugiere una acumulación de esta proteína en el tejido vascular proveniente del hígado y su posible implicación en la evolución de la enfermedad aterosclerótica.

Conclusions

The conclusions of this thesis are:

- ◆ PCSK9 is not expressed in macrophages, endothelium and vascular smooth muscle cells.
- ◆ PCSK9 is secreted mainly by the liver and its captured by macrophages, this reduces CD36 and LDL-R levels and its capture doesn't depend exclusively by this last receptor.
- ◆ PCSK9 increases the production of reactive oxygen species in macrophages, decrease the mitochondrial membrane potential and become these cells sensitive to death by necrosis.
- ◆ The PCSK9 dependent free radicals production come from the activation of the NADPH oxidase *NOX2* and its inhibition reverts this effect.
- ◆ PCSK9 induce a higher expression of *CD47* and *CXCL1* in macrophages and this promotes a discreet increase in migration in these cells.
- ◆ PCSK9 doesn't influence macrophage phagocytosis.
- ◆ Patients with hypercholesterolemia have increased serum levels of PCSK9 compared to controls.
- ◆ PCSK9 protein is expressed in advanced atherosclerotic lesions, which suggests an accumulation of this in vascular tissues from the liver and its possible role in the evolution of the atherosclerotic disease.

Bibliografía

Bibliografía

1. Lloyd-Jones, D. *et al.* Heart disease and stroke statistics - 2010 update: A report from the American heart association. *Circulation* **121**, (2010).
2. Heron, M. Deaths: leading causes for 2010. *Natl. vital Stat. reports from Centers Dis. Control Prev. Natl. Cent. Heal. Stat. Natl. Vital Stat. Syst.* **62**, 1–97 (2013).
3. Leibowitz, J. O. The history of coronary heart disease. *Los Angeles Univ. Calif. Press* 227 (1970).
4. WHO. World: Prevalence of raised blood cholesterol, ages 25+, age standardized: Both sexes. (2008).
5. Müller, C. Xanthomata, hypercholesterolemia, angina pectoris. *Acta Med. Scand.* **89**, 75–84 (1938).
6. Gofman, J.W., Delalla, O., Glazier, F., Freeman, N.K., Lindgren, F.T., N. & A.V., Strisower, B., and Tamplin, A. R. The serum lipoprotein transport system in health, metabolic disorders, atherosclerosis and coronary heart disease. *Plasma* **2**, 413–484 (1954).
7. Lucas, a D. & Greaves, D. R. Atherosclerosis: role of chemokines and macrophages. *Expert Rev. Mol. Med.* **3**, 1–18 (2001).
8. Goldstein, J.L., Anderson, R.G.W., and Brown, M. S. Coated pits, coated vesicles, and receptor-mediated endocytosis. *Nature* 679–685 (1979).
9. Anderson, R.G.W., Brown, M.S., and Goldstein, J. L. Role of the coated endocytic vesicle in the uptake of receptor-bound low density lipoprotein in human fibroblasts. *Cell* **10**, 351–364 (1977).
10. Brown, M.S., Ho, Y.K., and Goldstein, J. L. The cholesteryl ester cycle in macrophage foam cells. Continual hydrolysis and re-esterification of cytoplasmic cholesteryl esters. *J. Biol. Chem.* 9344–9352 (1980).
11. Nair, P. Brown and Goldstein: the cholesterol chronicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 14829–14832 (2013).
12. Brown, M.S., and Goldstein, J. L. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science (80-.).* 34–47 (1986).
13. Brown, M.S., and Goldstein, J. L. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* 331–

- 340 (1997).
14. Endo, A., Kuroda, M., and Tanzawa, K. Competitive inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase by ML-236A and ML-236B fungal metabolites, having hypocholesterolemic activity. *FEBS Lett.* **72**, 323–326 (1976).
 15. Mestas, J. & Ley, K. Monocyte-Endothelial Cell Interactions in the Development of Atherosclerosis. *Trends in Cardiovascular Medicine* **18**, 228–232 (2008).
 16. Glass, C. K. & Witztum, J. L. Atherosclerosis: The road ahead. *Cell* **104**, 503–516 (2001).
 17. Johnson, J. L. & Newby, A. C. Macrophage heterogeneity in atherosclerotic plaques. *Curr. Opin. Lipidol.* **20**, 370–378 (2009).
 18. Paulson, K. E. *et al.* Resident intimal dendritic cells accumulate lipid and contribute to the initiation of atherosclerosis. *Circ. Res.* **106**, 383–390 (2010).
 19. Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M. I. & Nourshargh, S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 678–689 (2007).
 20. Tacke, F. *et al.* Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques. *J. Clin. Invest.* **117**, 185–194 (2007).
 21. Chou, M. Y. *et al.* Oxidation-specific epitopes are important targets of innate immunity. in *Journal of Internal Medicine* **263**, 479–488 (2008).
 22. Podrez, E. A., Schmitt, D., Hoff, H. F. & Hazen, S. L. Myeloperoxidase-generated reactive nitrogen species convert LDL into an atherogenic form in vitro. *J. Clin. Invest.* **103**, 1547–1560 (1999).
 23. Kunjathoor, V. V. *et al.* Scavenger receptors class A-I/II and CD36 are the principal receptors responsible for the uptake of modified low density lipoprotein leading to lipid loading in macrophages. *J. Biol. Chem.* **277**, 49982–49988 (2002).
 24. Moore, K. J. & Freeman, M. W. Scavenger receptors in atherosclerosis: Beyond lipid uptake. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **26**, 1702–1711 (2006).
 25. Kzhyshkowska, J., Neyen, C. & Gordon, S. Role of macrophage scavenger receptors in atherosclerosis. *Immunobiology* **217**, 492–502 (2012).
 26. Kuchibhotla, S. *et al.* Absence of CD36 protects against atherosclerosis in ApoE knock-out mice with no additional protection provided by absence of scavenger

- receptor A I/II. *Cardiovasc. Res.* **78**, 185–196 (2008).
27. Manning-Tobin, J. J. *et al.* Loss of SR-A and CD36 activity reduces atherosclerotic lesion complexity without abrogating foam cell formation in hyperlipidemic mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **29**, 19–26 (2009).
 28. Kruth, H. S. Receptor-independent fluid-phase pinocytosis mechanisms for induction of foam cell formation with native low-density lipoprotein particles. *Curr. Opin. Lipidol.* **22**, 386–93 (2011).
 29. Kruth, H. S. *et al.* Macropinocytosis is the endocytic pathway that mediates macrophage foam cell formation with native low density lipoprotein. *J. Biol. Chem.* **280**, 2352–60 (2005).
 30. Kruth, H. S., Huang, W., Ishii, I. & Zhang, W.-Y. Macrophage foam cell formation with native low density lipoprotein. *J. Biol. Chem.* **277**, 34573–34580 (2002).
 31. Kanters, E. *et al.* Inhibition of NF- κ B activation in macrophages increases atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *J. Clin. Invest.* **112**, 1176–1185 (2003).
 32. Gareus, R. *et al.* Endothelial Cell-Specific NF- κ B Inhibition Protects Mice from Atherosclerosis. *Cell Metab.* **8**, 372–383 (2008).
 33. Moore, K. J. & Tabas, I. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. *Cell* **145**, 341–355 (2011).
 34. Tabas, I. Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 117 (2010).
 35. Yvan-Charvet, L., Wang, N. & Tall, A. R. Role of HDL, ABCA1, and ABCG1 transporters in cholesterol efflux and immune responses. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **30**, 139–143 (2010).
 36. Spann, N. J. *et al.* Regulated accumulation of desmosterol integrates macrophage lipid metabolism and inflammatory responses. *Cell* **151**, 138–152 (2012).
 37. Chinetti-Gbaguidi, G. *et al.* Human atherosclerotic plaque alternative macrophages display low cholesterol handling but high phagocytosis because of distinct activities of the PPAR γ and LXR α pathways. *Circ. Res.* **108**, 985–995 (2011).
 38. Adamson, S. & Leitinger, N. Phenotypic modulation of macrophages in response

- to plaque lipids. *Curr. Opin. Lipidol.* **22**, 335–342 (2011).
39. Hanna, R. N. *et al.* The transcription factor NR4A1 (Nur77) controls bone marrow differentiation and the survival of Ly6C⁺ monocytes. *Nat. Immunol.* **12**, 778–785 (2011).
 40. Chao, L. C. *et al.* Bone marrow NR4A expression is not a dominant factor in the development of atherosclerosis or macrophage polarization in mice. *J. Lipid Res.* **54**, 806–815 (2013).
 41. Hamers, A. A. J. *et al.* Bone marrow-specific deficiency of nuclear receptor Nur77 enhances atherosclerosis. *Circ. Res.* **110**, 428–438 (2012).
 42. Hanna, R. N. *et al.* NR4A1 (Nur77) deletion polarizes macrophages toward an inflammatory phenotype and increases atherosclerosis. *Circ. Res.* **110**, 416–427 (2012).
 43. Horton, J. D., Cohen, J. C. & Hobbs, H. H. Molecular biology of PCSK9: its role in LDL metabolism. *Trends in Biochemical Sciences* **32**, 71–77 (2007).
 44. Seidah, N. G., Awan, Z., Chrétien, M. & Mbikay, M. PCSK9: A key modulator of cardiovascular health. *Circ. Res.* **114**, 1022–1036 (2014).
 45. Seidah, N. G., Khatib, A. M. & Prat, A. The proprotein convertases and their implication in sterol and/or lipid metabolism. *Biol. Chem.* **387**, 871–877 (2006).
 46. Guo, Y. L., Zhang, W. & Li, J. J. PCSK9 and lipid lowering drugs. *Clin. Chim. Acta* **437**, 66–71 (2014).
 47. Costet, P., Krempf, M. & Cariou, B. PCSK9 and LDL cholesterol: unravelling the target to design the bullet. *Trends Biochem. Sci.* **33**, 426–434 (2008).
 48. Cohen, J. C. Emerging LDL therapies: Using human genetics to discover new therapeutic targets for plasma lipids. *J. Clin. Lipidol.* **7**, S1–5 (2014).
 49. Seidah, N. G. PCSK9 as a therapeutic target of dyslipidemia. *Expert Opin. Ther. Targets* **13**, 19–28 (2009).
 50. Seidah, N. G. *et al.* The activation and physiological functions of the proprotein convertases. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **40**, 1111–1125 (2008).
 51. Lagace, T. A. *et al.* Secreted PCSK9 decreases the number of LDL receptors in hepatocytes and in livers of parabiotic mice. *J. Clin. Invest.* **116**, 2995–3005 (2006).
 52. Luo, Y. *et al.* Function and distribution of circulating human PCSK9 expressed

- extrahepatically in transgenic mice. *J. Lipid Res.* **50**, 1581–1588 (2009).
53. Grefhorst, A., McNutt, M. C., Lagace, T. A. & Horton, J. D. Plasma PCSK9 preferentially reduces liver LDL receptors in mice. *J. Lipid Res.* **49**, 1303–1311 (2008).
 54. Lagace, T. A. PCSK9 and LDLR degradation: regulatory mechanisms in circulation and in cells. *Curr. Opin. Lipidol.* **25**, 387–93 (2014).
 55. Dubuc, G. *et al.* Statins upregulate PCSK9, the gene encoding the proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase-1 implicated in familial hypercholesterolemia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**, 1454–1459 (2004).
 56. Dong, B., Li, H., Singh, A. B., Cao, A. & Liu, J. Inhibition of PCSK9 transcription by Berberine involves down-regulation of hepatic HNF1?? protein expression through the ubiquitin-proteasome degradation pathway. *J. Biol. Chem.* **290**, 4047–4058 (2015).
 57. Hong, C. & Tontonoz, P. Coordination of inflammation and metabolism by PPAR and LXR nuclear receptors. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **18**, 461–467 (2008).
 58. Chawla, A. *et al.* A PPAR??-LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis. *Mol. Cell* **7**, 161–171 (2001).
 59. Faulds, M. H., Zhao, C. & Dahlman-Wright, K. Molecular biology and functional genomics of liver X receptors (LXR) in relationship to metabolic diseases. *Curr. Opin. Pharmacol.* **10**, 692–697 (2010).
 60. Walley, K. R. *et al.* PCSK9 is a critical regulator of the innate immune response and septic shock outcome. *Sci. Transl. Med.* **6**, 258ra143 (2014).
 61. Ferri, N. *et al.* Proprotein convertase subtilisin kexin type 9 (PCSK9) secreted by cultured smooth muscle cells reduces macrophages LDLR levels. *Atherosclerosis* **220**, 381–386 (2012).
 62. Turpeinen, H. *et al.* Proprotein convertases in human atherosclerotic plaques: The overexpression of *FURIN* and its substrate cytokines *BAFF* and *APRIL*. *Atherosclerosis* **219**, 799–806 (2011).
 63. Wen, B. *et al.* NIH Public Access. *October* **454**, 42–54 (2007).
 64. Tang, Z. *et al.* PCSK9 siRNA suppresses the inflammatory response induced by oxLDL through inhibition of NF- κ B activation in THP-1-derived macrophages. *Int. J. Mol. Med.* **30**, 931–938 (2012).

65. Schramm, A., Matusik, P., Osmenda, G. & Guzik, T. J. Targeting NADPH oxidases in vascular pharmacology. *Vascular Pharmacology* **56**, 216–231 (2012).
66. Guzik, T. J. & Harrison, D. G. Vascular NADPH oxidases as drug targets for novel antioxidant strategies. *Drug Discovery Today* **11**, 524–533 (2006).
67. Landmesser, U. *et al.* Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J. Clin. Invest.* **111**, 1201–1209 (2003).
68. Dikalova, A. E. *et al.* Upregulation of Nox1 in vascular smooth muscle leads to impaired endothelium-dependent relaxation via eNOS uncoupling. *AJP Hear. Circ. Physiol.* **299**, H673–H679 (2010).
69. Konior, A., Schramm, A., Czesnikiewicz-Guzik, M. & Guzik, T. J. NADPH Oxidases in Vascular Pathology. *Antioxid. Redox Signal.* **20**, 2794–2814 (2014).
70. De Keulenaer, G. W., Alexander, R. W., Ushio-Fukai, M., Ishizaka, N. & Griendling, K. K. Tumour necrosis factor alpha activates a p22phox-based NADH oxidase in vascular smooth muscle. *Biochem. J.* **329** (Pt 3, 653–7 (1998).
71. Brandes, R. P. *et al.* Thrombin-induced MCP-1 expression involves activation of the P22phox-containing NADPH oxidase in human vascular smooth muscle cells. *Thromb. Haemost.* **85**, 1104–1110 (2001).
72. Jansen, F. *et al.* High glucose condition increases NADPH oxidase activity in endothelial microparticles that promote vascular inflammation. *Cardiovasc. Res.* **98**, 94–106 (2013).
73. Bedard, K. & Krause, K.-H. The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology. *Physiol. Rev.* **87**, 245–313 (2007).
74. Drummond, G. R. & Sobey, C. G. Endothelial NADPH oxidases: Which NOX to target in vascular disease? *Trends Endocrinol. Metab.* **25**, 452–463 (2014).
75. Van Buul, J. D., Fernandez-Borja, M., Anthony, E. C. & Hordijk, P. L. Expression and localization of NOX2 and NOX4 in primary human endothelial cells. *Antioxid Redox Signal* **7**, 308–317 (2005).
76. Hwang, J. *et al.* Pulsatile Versus Oscillatory Shear Stress Regulates NADPH Oxidase Subunit Expression: Implication for Native LDL Oxidation. *Circ. Res.* **93**, 1225–1232 (2003).
77. Paravicini, T. M. & Touyz, R. M. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and

- hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes care* **31 Suppl 2**, (2008).
78. Kawano, M., Miyamoto, K., Kaito, Y., Sumimoto, H. & Tamura, M. Noxa1 as a moderate activator of Nox2-based NADPH oxidase. *Arch. Biochem. Biophys.* **519**, 1–7 (2012).
 79. de Oliveira-Junior, E. B., Bustamante, J., Newburger, P. E. & Condino-Neto, A. The human NADPH oxidase: Primary and secondary defects impairing the respiratory burst function and the microbicidal ability of phagocytes. *Scandinavian Journal of Immunology* **73**, 420–427 (2011).
 80. Holland, S. M. Chronic granulomatous disease. *Hematol Oncol Clin North Am* **27**, 89–99, viii (2013).
 81. Montezano, A. C. *et al.* Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced oxidase 5 (Nox5) regulation by angiotensin II and endothelin-1 is mediated via calcium/calmodulin-dependent, Rac-1-independent pathways in human endothelial cells. *Circ. Res.* **106**, 1363–1373 (2010).
 82. Bauldry, S. A., Elsey, K. L. & Bass, D. A. Activation of NADPH oxidase and phospholipase D in permeabilized human neutrophils. Correlation between oxidase activation and phosphatidic acid production. *J. Biol. Chem.* **267**, 25141–25152 (1992).
 83. Adachi, Y. *et al.* Oncogenic Ras upregulates NADPH oxidase 1 gene expression through MEK-ERK-dependent phosphorylation of GATA-6. *Oncogene* **27**, 4921–4932 (2008).
 84. Purushothaman, D. & Sarin, A. Cytokine-dependent regulation of NADPH oxidase activity and the consequences for activated T cell homeostasis. *J. Exp. Med.* **206**, 1515–1523 (2009).
 85. Pendyala, S., Usatyuk, P. V., Gorshkova, I. A., Garcia, J. G. N. & Natarajan, V. Regulation of NADPH Oxidase in Vascular Endothelium: The Role of Phospholipases, Protein Kinases, and Cytoskeletal Proteins. *Antioxid. Redox Signal.* **11**, 841–860 (2009).
 86. Griendling, K. K., Minieri, C. a, Ollerenshaw, J. D. & Alexander, R. W. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* **74**, 1141–1148 (1994).

87. Jaatinen, T. & Laine, J. Isolation of mononuclear cells from human cord blood by Ficoll-Paque density gradient. *Curr Protoc Stem Cell Biol* **Chapter 2**, Unit 2A 1 (2007).
88. Royo, S. *et al.* Differential Induction of Apoptosis, Interferon Signaling, and Phagocytosis in Macrophages Infected with a Panel of Attenuated and Nonattenuated Poxviruses. *J. Virol.* **88**, 5511–5523 (2014).
89. Rios, F. J., Touyz, R. M. & Montezano, A. C. in *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **1527**, 297–309 (2017).
90. Daigneault, M., Preston, J. A., Marriott, H. M., Whyte, M. K. B. & Dockrell, D. H. The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PLoS One* **5**, (2010).
91. Lu, S. *et al.* Isolation and culture of smooth muscle cells from human acute type A aortic dissection. *J. Cardiothorac. Surg.* **8**, 83 (2013).
92. Través, P. G. *et al.* Pivotal role of protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) in the macrophage response to pro-inflammatory and anti-inflammatory challenge. *Cell Death Dis.* **5**, e1125 (2014).
93. Jaguin, M., Houlbert, N., Fardel, O. & Lecureur, V. Polarization profiles of human M-CSF-generated macrophages and comparison of M1-markers in classically activated macrophages from GM-CSF and M-CSF origin. *Cell. Immunol.* **281**, 51–61 (2013).
94. Anderson, E. M. *et al.* Experimental validation of the importance of seed complement frequency to siRNA specificity. *RNA* **14**, 853–61 (2008).
95. Cong, L. *et al.* Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* **339**, 819–23 (2013).
96. Mali, P. *et al.* RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* **339**, 823–6 (2013).
97. Ran, F. A. *et al.* Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat. Protoc.* **8**, 2281–2308 (2013).
98. van der Oost, J., Westra, E. R., Jackson, R. N. & Wiedenheft, B. Unravelling the structural and mechanistic basis of CRISPR–Cas systems. *Nat. Rev. Microbiol.* **12**, 479–492 (2014).
99. Shalem, O. *et al.* Genome-Scale CRISPR-Cas9 Knockout Screening in Human

- Cells. *Science* (80-.). **343**, 84–87 (2014).
100. Eruslanov, E. & Kusmartsev, S. Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry. *Methods Mol. Biol.* **594**, 57–72 (2010).
 101. Amer, J., Goldfarb, A. & Fibach, E. Flow cytometric measurement of reactive oxygen species production by normal and thalassaemic red blood cells. *Eur. J. Haematol.* **70**, 84–90 (2003).
 102. Bindokas, V. P., Jordán, J., Lee, C. C. & Miller, R. J. Superoxide production in rat hippocampal neurons: selective imaging with hydroethidine. *J. Neurosci.* **16**, 1324–36 (1996).
 103. Kojima, H. *et al.* Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diaminofluoresceins. *Anal. Chem.* **70**, 2446–2453 (1998).
 104. Cummings, B. S., Wills, L. P. & Schnellmann, R. G. Measurement of Cell Death in Mammalian Cells. *Curr Protoc Pharmacol* **1**, 1–30 (2004).
 105. Koopman, G. *et al.* Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* **84**, 1415–20 (1994).
 106. Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H. & Reutellingsperger, C. A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J. Immunol. Methods* **184**, 39–51 (1995).
 107. Underhill, D. M. Macrophage recognition of zymosan particles. *J. Endotoxin Res.* **9**, 176–180 (2003).
 108. Wu, S. C. & Zhang, Y. Active DNA demethylation: many roads lead to Rome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 750–750 (2010).
 109. Hammond, J. B. & Kruger, N. J. The bradford method for protein quantitation. *Methods Mol. Biol.* **3**, 25–32 (1988).
 110. Baxter, A. *et al.* Squalostatins 1, a potent inhibitor of squalene synthase, which lowers serum cholesterol in vivo. *J. Biol. Chem.* **267**, 11705–11708 (1992).
 111. Ding, Z. *et al.* Hemodynamic Shear Stress via ROS Modulates PCSK9 Expression in Human Vascular Endothelial and Smooth Muscle Cells and Along the Mouse Aorta. *Antioxid. Redox Signal.* **22**, 760–771 (2015).

112. Seidah, N. G., Awan, Z., Chrétien, M. & Mbikay, M. PCSK9: A key modulator of cardiovascular health. *Circ. Res.* **114**, 1022–1036 (2014).
113. Baxter, A. et al. Squalostatins 1, a potent inhibitor of squalene synthase, which lowers serum cholesterol in vivo. *J. Biol. Chem.* **267**, 11705–11708 (1992).
114. Nair, P. Brown and Goldstein: the cholesterol chronicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 14829–14832 (2013).
115. Ceresa, B. P., Kao, W., Santeler, S. R. & Pessin, J. E. Inhibition of clathrin-mediated endocytosis selectively attenuates specific insulin receptor signal transduction pathways. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 3862–3870 (1998).
116. Charney, L. H. & Vascular, R. B. Macrophages in atherosclerosis : a dynamic balance. *13*, 709–721 (2015).
117. Drummond, G. R. & Sobey, C. G. Endothelial NADPH oxidases: Which NOX to target in vascular disease? *Trends Endocrinol. Metab.* **25**, 452–463 (2014).
118. Forman, H. J. & Torres, M. Reactive oxygen species and cell signaling: Respiratory burst in macrophage signaling. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **166**, (2002).
119. Koopman, G. et al. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* **84**, 1415–20 (1994).
120. Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H. & Reutellingsperger, C. A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J. Immunol. Methods* **184**, 39–51 (1995).
121. Hertzuala, S. et al. Stabilization of atherosclerotic plaques: An update. *Eur. Heart J.* **34**, 3251–3258 (2013).
122. Sancho, P. & Fabregat, I. The NADPH oxidase inhibitor VAS2870 impairs cell growth and enhances TGF- β -induced apoptosis of liver tumor cells. *Biochem. Pharmacol.* **81**, 917–924 (2011).
123. Demers, A. et al. PCSK9 Induces CD36 Degradation and Affects Long-Chain Fatty Acid Uptake and Triglyceride Metabolism in Adipocytes and in Mouse Liver. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **35**, 2517–2525 (2015).
124. Tacke, F. et al. Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1

- to accumulate within atherosclerotic plaques. *J. Clin. Invest.* **117**, 185–194 (2007).
125. Swirski, F. K. *et al.* Ly-6Chi monocytes dominate hypercholesterolemia-associated monocytosis and give rise to macrophages in atheromata. *J. Clin. Invest.* **117**, 195–205 (2007).
 126. Kadl, A. *et al.* Identification of a novel macrophage phenotype that develops in response to atherogenic phospholipids via Nrf2. *Circ. Res.* **107**, 737–746 (2010).
 127. Libby, P. Inflammation and Atherosclerosis. *Circulation* **105**, 1135–1143 (2002).
 128. O'Brien, K. D., McDonald, T. O., Chait, A., Allen, M. D. & Alpers, C. E. Neovascular Expression of E-Selectin, Intercellular Adhesion Molecule-1, and Vascular Cell Adhesion Molecule-1 in Human Atherosclerosis and Their Relation to Intimal Leukocyte Content. *Circulation* **93**, 672–682 (1996).
 129. Liu, L. S. *et al.* PCSK9 Promotes oxLDL-Induced PC12 Cell Apoptosis Through the Bcl-2/Bax-Caspase 9/3 Signaling Pathway. *J. Alzheimer's Dis.* **57**, 723–734 (2017).
 130. Tang, Z. *et al.* PCSK9 siRNA suppresses the inflammatory response induced by oxLDL through inhibition of NF-κB activation in THP-1-derived macrophages. *Int. J. Mol. Med.* **30**, 931–938 (2012).
 131. Judkins CP, Diep H, Broughton BR, Mast AE, H. E., Miller AA, Selemidis S, Dusting GJ, Sobey CG, A. & GR., D. Direct evidence of a role for Nox2 in superoxide production, reduced nitric oxide bioavailability, and early atherosclerotic plaque formation in ApoE-/- mice. *Am J Physiol Hear. Circ Physiol* 24–32 (2010).
 132. Kirk EA, Dinauer MC, Rosen H, Chait A, Heinecke JW, A. & RC, L. Impaired superoxide production due to a deficiency in phagocyte NADPH oxidase fails to inhibit atherosclerosis in mice. *Arter. Thromb Vasc Biol* **20**, 1529–1535 (2000).
 133. Hsich, E. *et al.* Vascular Effects Following Homozygous Disruption of p47phox : An Essential Component of NADPH Oxidase. *Circulation* **101**, 1234–1236 (2000).
 134. Douglas, G. *et al.* Endothelial-specific Nox2 overexpression increases vascular superoxide and macrophage recruitment in ApoE -/- mice. *Cardiovasc. Res.* **94**, 20–29 (2012).
 135. Barry-Lane, P. A. *et al.* p47phox is required for atherosclerotic lesion progression in ApoE-/- mice. *J. Clin. Invest.* **108**, 1513–1522 (2001).

136. Simpson, C. S. & Morris, B. J. Regulation of neuronal cell adhesion molecule expression by NF-kappa B. *J. Biol. Chem.* **275**, 16879–84 (2000).
137. De Filippo, K. *et al.* Mast cell and macrophage chemokines CXCL1/CXCL2 control the early stage of neutrophil recruitment during tissue inflammation. *Blood* **121**, 4930–4937 (2013).
138. Oldenborg, P.-A. CD47: A Cell Surface Glycoprotein Which Regulates Multiple Functions of Hematopoietic Cells in Health and Disease. *ISRN Hematol.* **2013**, 1–19 (2013).
139. Violi, F. *et al.* Hereditary deficiency of gp91phox is associated with enhanced arterial dilatation: Results of a multicenter study. *Circulation* **120**, 1616–1622 (2009).
140. Violi, F. *et al.* Reduced atherosclerotic burden in subjects with genetically determined low oxidative stress. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **33**, 406–412 (2013).
141. Sabatine, M. S. *et al.* Evolocumab and Clinical Outcomes in Patients with Cardiovascular Disease. *N. Engl. J. Med.* **376**, 1713–1722 (2017).